

Université de Montréal

Effet aigu et chronique du tamoxifène sur la repolarisation cardiaque chez la souris

Par

Gracia El Gebeily

Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de maîtrise

en pharmacie

option pharmacologie

Octobre, 2006

© Gracia El Gebeily, 2006



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Effet aigu et chronique du tamoxifène sur la repolarisation cardiaque chez la souris

Présenté par :
Gracia El Gebeily

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Huy Ong, président-rapporteur
Dr Céline Fiset, directrice de recherche
Dr Lucie Parent, membre du jury

RÉSUMÉ

Le tamoxifène est le modulateur sélectif des récepteurs aux oestrogènes le plus utilisé dans le traitement et la prévention du cancer du sein. Des études ont démontré que tout comme les oestrogènes, l'administration aiguë du tamoxifène ou de son métabolite actif, le 4-hydroxytamoxifène pouvait réduire certains courants K^+ cardiaques, suggérant que chez les patientes le tamoxifène risquerait d'entraîner une prolongation de l'intervalle QT et ainsi favoriser le développement d'arythmies. Toutefois, en clinique le tamoxifène n'est pas associé à une prolongation de l'intervalle QT laissant présager la présence d'un mécanisme compensatoire. Nous avons donc comparé l'effet aigu et chronique du tamoxifène sur les courants K^+ présents au niveau des myocytes ventriculaires de souris : le courant K^+ (1) transitoire sortant indépendant du Ca^{2+} (I_{to}), (2) à rectification retardée ultrarapide (I_{Kur}), (3) sortant à l'équilibre (I_{ss}) et (4) à rectification entrante (I_{K1}). L'application aiguë de 4-hydroxytamoxifène (0.5, 1 et 10 μM) sur les myocytes a permis de démontrer que la densité de I_{to} , I_{Kur} et I_{K1} était réduite de façon concentration-dépendante alors que celle de I_{ss} n'était pas affectée. Afin de déterminer si l'exposition à long terme au tamoxifène affectait aussi les courants K^+ , des souris femelles (CTL) ont été traitées avec du tamoxifène (implants libérant 5 mg sur 60 jours). Comparativement à leurs témoins, les souris traitées ont présenté des augmentations significatives de l'intensité des courants I_{to} , I_{Kur} , I_{K1} et I_{ss} (* $p < 0.05$).

Pourcentage moyen d'augmentation des courants				
	I_{to} (à +30mV)	I_{kur} (à +30mV)	I_{ss} (à +30mV)	I_{kl} (à -110 mV)
CTL + TAM	66±6%*	59±13%*	46±16%*	54±13%*

Il est fort probable qu'en inhibant les récepteurs aux oestrogènes, le tamoxifène puisse annuler l'effet inhibiteur des oestrogènes sur les courants K^+ . Ceci pourrait expliquer l'augmentation des courants K^+ observée dans cette étude ainsi que l'absence d'effet néfaste du tamoxifène sur l'intervalle QT et le rythme cardiaque lors d'un traitement à long terme avec le tamoxifène.

Mots-clés : tamoxifène, 4-hydroxytamoxifène, cancer du sein, électrophysiologie, coeur, ventricule, souris, aiguë, chronique.

ABSTRACT

Tamoxifen is a selective estrogen receptor modulator that has both agonist and antagonist activities depending on the molecular profile of its target. Tamoxifen is widely used in the prevention and treatment of breast cancer. Experimental studies reported that acute exposure to tamoxifen or its active metabolite 4-hydroxytamoxifen could reduce cardiac ionic currents. Thus, it is surprising that women receiving long term tamoxifen therapy are not consistently experiencing cardiac rhythm abnormalities. This suggests that adaptation mechanism might be operative.

To test this hypothesis, we compared the acute and chronic effects of tamoxifen on K^+ currents present in mouse female ventricular myocytes. These currents include the Ca^{2+} -independent transient outward (I_{to}), the ultra-rapid delayed rectifier (I_{Kur}), the steady-state (I_{ss}) and the inward rectifier (I_{K1}) K^+ currents. We first assessed the acute exposure of 4-hydroxytamoxifen on these currents. Using whole-cell voltage-clamp technique, the K^+ currents were recorded under control conditions and after perfusion of the cells with 4-hydroxytamoxifen applied at different concentrations (0.5, 1 and 10 μM). 4-hydroxytamoxifen markedly decreased I_{to} , I_{Kur} , I_{K1} whereas I_{ss} was unaffected.

We then determined whether long term exposure to tamoxifen affected the density of these K^+ currents. Female mice were used and treated with placebo or tamoxifen pellets (5 mg/pellet, 60 day release). Results obtained in these experiments indicate that the density of all the K^+ currents was significantly increased in the ventricular myocytes of the tamoxifen treated mice compared to the control mice. (* $p < 0.05$).

Percentage of augmentation (relative to baseline)				
	I_{to} (at +30mV)	I_{kur} (at +30mV)	I_{ss} (at +30mV)	I_{kl} (at -110 mV)
CTL + TAM	66±6%*	59±13%*	46±16%*	54±13%*

Findings reported here could contribute to explain the absence of cardiac rhythm defects with chronic treatment with tamoxifen. Indeed, although acute exposure to 4-hydroxytamoxifen inhibits K^+ currents at therapeutic concentrations, it appears that compensatory mechanisms take place with long term exposure. It is probable that while blocking the estrogen receptor tamoxifen can remove the inhibiting effect of the estrogen on the currents K^+ which could explain the increase of the currents K^+ observed in this study. Hence, these results provide new insight into the understanding of the basic mechanisms of action of tamoxifen on cardiac electrophysiology.

Keywords: tamoxifen, 4-hydroxytamoxifen, breast cancer, electrophysiology, ventricle, mouse, acute, chronic.

Table des matières

1	Introduction.....	16
1.1	<i>Tamoxifène.....</i>	<i>16</i>
1.1.1	Considérations cliniques et propriétés du tamoxifène.....	16
1.1.2	Mode d'action du tamoxifène	18
1.1.3	Pharmacocinétique du tamoxifène.....	19
1.1.3.1	Le 4-hydroxytamoxifène.....	20
1.2	<i>Activité électrique cardiaque.....</i>	<i>21</i>
1.2.1	Électrophysiologie et potentiel d'action.....	21
1.3	<i>Dérèglement de la repolarisation.....</i>	<i>30</i>
1.3.1	Allongement de l'intervalle QT et Torsades de pointes.....	30
1.3.2	Le syndrome du Long QT (LQT) acquis.....	32
1.4	<i>Problématique.....</i>	<i>36</i>
1.5	<i>Objectis spécifique de l'étude.....</i>	<i>38</i>
2	Méthodes.....	40
2.1	<i>Isolation des myocytes ventriculaires.....</i>	<i>40</i>
2.2	<i>Enregistrement électrophysiologique.....</i>	<i>40</i>
2.3	<i>Courbes courant-voltage (I.V).....</i>	<i>42</i>
2.4	<i>Inactivation à l'équilibre de I_{Kur}.....</i>	<i>44</i>
2.5	<i>Recouvrement de l'inactivation de I_{Kur}</i>	<i>44</i>

3	Résultats.....	46
3.1	<i>Étude aiguë.....</i>	<i>46</i>
3.1.1	Effet du 4-hydroxytamoxifène sur le potentiel d'action chez la souris	46
3.1.2	Effet du 4-hydroxytamoxifène sur les courants potassiques.....	46
3.1.2.1	Effet du 4-hydroxytamoxifène sur I_{peak}	47
3.1.2.2	Effet du 4-hydroxytamoxifène sur I_{to}	50
3.1.2.3	Effet du 4-hydroxytamoxifène sur I_{Kur}	53
3.1.2.4	Effet du 4-hydroxytamoxifène sur I_{K1}	55
3.1.2.5	Effet du 4-hydroxytamoxifène sur I_{ss}	57
3.1.2.6	Effet du ICI 182,780 et de l'actinomycine D sur les courants potassiques..	58
3.1.2.7	Cinétique.....	59
3.2	<i>Étude chronique.....</i>	<i>60</i>
3.2.1	Effet du tamoxifène sur le potentiel d'action chez la souris.....	60
3.2.2	Effet du tamoxifène sur les courants potassiques chez la souris.....	61
3.2.2.1	Effet du tamoxifène sur I_{to}	61
3.2.2.2	Effet du tamoxifène sur I_{Kur}	63
3.2.2.3	Effet du tamoxifène sur I_{K1} et I_{ss}	65
4	Discussion.....	66
4.1	Importance du « modèle souris » pour l'étude du système cardiaque.....	66
4.2	Résumé des études présentées dans ce mémoire.....	68
4.3	Mécanismes pouvant expliquer les effets opposés du tamoxifène.....	70
4.4	Directions futures.....	72

5	Conclusion.....	76
----------	------------------------	-----------

	Bibliographie.....	77
--	--------------------	----

Liste des figures

Figure 1. Effet agoniste et antagoniste du tamoxifène.....	19
Figure 2. Structure chimique du tamoxifène et du 4-hydroxytamoxifène.....	21
Figure 3. Terminologie de l'électrocardiographie.....	23
Figure 4a et 4b. Relation entre les canaux ioniques, les courants et les gènes correspondants.....	26
Figure 5. Corrélation entre les mouvements ioniques transmembranaires, le potentiel d'action et l'ECG.....	29
Figure 6. La séparation des courants potassiques.....	43
Figure 7. Effet concentration-dépendant du 0.5, 1 et 10 μM de 4-hydroxytamoxifène sur I_{peak} à +30 mV.....	48
Figure 8a. Effet du 10 μM de 4-hydroxytamoxifène sur I_{peak}	49
Figure 8b. Courbe courant-voltage de I_{peak} avant et après application de 10 μM de 4-hydroxytamoxifène.....	49
Figure 9. Effet concentration-dépendant du 0.5, 1 et 10 μM de 4-hydroxytamoxifène sur I_{to} à +30 mV.....	50
Figure 10a. Effet du 10 μM de 4-hydroxytamoxifène sur I_{to}	52
Figure 10b. Courbe courant-voltage de I_{to} avant et après application de 10 μM de 4-hydroxytamoxifène.....	52
Figure 11. Effet concentration-dépendant du 0.5, 1 et 10 μM de 4-hydroxytamoxifène sur I_{Kur} à +30 mV.....	54

Figure 12. Courbe courant-voltage de I_{Kur} avant et après perfusion de 10 μ M de 4-hydroxytamoxifène.....	55
Figure 13. Effet concentration-dépendant du 0.5, 1 et 10 μ M de 4-hydroxytamoxifène sur I_{K1} à -110 mV.....	56
Figure 14. Courbe courant-voltage de I_{K1} et I_{ss} avant et après perfusion avec 10 μ M de 4-hydroxytamoxifène.....	57
Figure 15. Effet concentration-dépendant du 0.5, 1 et 10 μ M de 4-hydroxytamoxifène sur I_{ss} à +30 mV.....	58
Figure 16. Diminution de la durée du potentiel d'action dans le groupe traité par le tamoxifène comparé au groupe témoin.....	61
Figure 17a. Effet chronique du tamoxifène sur I_{to}	62
Figure 17b. Courbe courant-voltage de I_{to} sans et avec traitement par le tamoxifène	62
Figure 18a. I_{Kur} avant et après traitement chronique par le tamoxifène.....	64
Figure 18b. Courbe courant-voltage de I_{Kur} sans et avec traitement par le tamoxifène.....	64

Liste des sigles et abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

4-AP : 4-Aminopyridine

AP : Potentiel d'action

APD : Durée du potentiel d'action

APD₉₀ : Durée du potentiel d'action mesurée à 90% de la repolarisation

ARN : Acide ribonucléique

BSA : Albumine sérique de boeuf

CaCl₂ : Chlorure de calcium

CsCl : Chlorure de césium

ECG : Électrocardiogramme

EDTA : Acide d'éthylène diamine tétraacétique

ERE : Éléments de réponse aux œstrogènes

HEPES : Acide (hydroxy-2-éthyl-4-pipérazinyl-1)-2-éthanesulfonique

HDL : "High density lipoprotein "

I_{Ca-L} : Courant calcique de type L

I_{K1} : Courant K⁺ à rectification entrante

I_{Kr} : Composante rapide du courant K⁺ à rectification retardée

I_{Ks} : Composante lente du courant K⁺ à rectification retardée

I_{Kur} : Courant K⁺ à rectification retardée ultrarapide

I_{Na} : Courant sodique entrant

I_{ss} : Courant K⁺ soutenu

I_{to} : Courant K⁺ transitoire sortant indépendant du calcium

K⁺-Aspartate : Potassium Aspartate

K₂ATP : Dipotassium adénosine 5' -tri-phosphate

LDL : "Low density lipoprotein"

LQTS : Syndrome du long QT

Na⁺ : Sodium

OVX : Ovariectomie, Ovariectomisé

QTc : Intervalle QT corrigé pour le rythme cardiaque

MgATP : Magnésium adénosine-tri-phosphate

MgCl₂ : Chlorure de magnésium

Mg SO₄ : Sulfate de magnésium

Na₂HPO₄ : Sodium phosphate

NaCl : Chlorure de sodium

RE : Récepteurs oestrogéniques

Re α : Récepteurs oestrogéniques type α

Re β : Récepteurs oestrogéniques type β

SERM : Modulateurs sélectifs des récepteurs aux oestrogènes

TdP : Torsade de pointes

*J'ai pour principe de ne jamais oublier
tous ceux qui m'ont un jour aidé ou tendu la main.
Que cela soit dans un moment difficile,
moment de doute ou d'interrogation, ou tout simplement tranche de vie, tous ceux qui ont
été présents au moment où il
fallait l'être restent à jamais des êtres chers qui méritent toute ma considération.*

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier vivement ma directrice de mémoire, Dr Céline Fiset pour son aide compétente, pour sa patience sans égal et pour son encadrement exceptionnel durant mes deux années d'étude. Je lui remercie d'avoir trouvé les mots d'encouragement me poussant à me surpasser dans les moments les plus difficiles. Je lui est extrêmement reconnaissante.

Je remercie Dr Huy Ong et Dr Lucie Parent de me faire l'honneur d'évaluer ce mémoire.

Des sincères remerciements aux gens de mon laboratoire (Chantal Saint-Michel, Marie-Andrée Lupien, Judith Brouillette, Katy Rivard, Anne Louise Ménard, Scott Grandy et Frédéric Mercier) ainsi qu'à Marc Antoine Gillis qui, par leur ouverture, leur bonne humeur et leur enthousiasme créent un environnement de travail favorable et stimulant. J'aimerais également remercier le Centre de Recherche de l'institut de Cardiologie de Montréal pour avoir mis à ma disposition des aménagements et services ayant facilité la réalisation de mes travaux.

Je termine en remerciant mes parents, mon frère et mes soeurs qui, malgré la distance, me font encore plus aimer la vie.

1 INTRODUCTION

1.1 TAMOXIFÈNE

1.1.1 *Considérations cliniques et propriétés du tamoxifène*

Les modulateurs sélectifs des récepteurs aux oestrogènes (SERMs), un groupe de médicaments de structure chimique non stéroïdienne, sont des ligands des récepteurs oestrogéniques. Dans certains tissus, ces médicaments ont la capacité de bloquer l'action des œstrogènes (antagoniste) rendant ainsi le récepteur inefficace. Tandis que dans d'autres tissus, ces médicaments peuvent imiter l'action des œstrogènes (agoniste) et donc développer un effet œstrogénique pur (Osborne et coll., 2000).

Le tamoxifène est le SERM le plus utilisé dans la prévention et le traitement des cancers œstrogéno-dépendants (Mouridsen et coll., 2003; Cuzick et coll., 2002; Park et coll., 2002). Découvert en 1962, avant la découverte des récepteurs oestrogéniques, il est aujourd'hui bien implanté en première ligne de traitement et prévention de ce type de cancer. Le tamoxifène est synthétisé en 1966 après l'éthamoxytriphétol (MER25) et le clomiphène. Son autorisation de mise sur le marché a été donnée après la phase II en 1976. Aux États-Unis, la Food and Drug Administration (FDA) a approuvé son utilisation en 1978. Le tamoxifène est un dérivé œstrogénique dont diverses substitutions ont été effectuées pour réduire au minimum son effet œstrogénique tout en gardant son effet de captation par les récepteurs oestrogéniques. Il est utilisé sous forme orale dans le cancer du sein en phase précoce ou avancé chez les femmes pré- et post-ménopausées, et est

pour l'instant le traitement le plus utilisé dans le cadre du traitement de ce cancer (Newcomb et coll., 1994; Powles et coll., 1992; Jaiyesimi et coll., 1995). De plus, le tamoxifène administré en traitement adjuvant pendant cinq ans chez les patientes opérées pour un cancer du sein ayant des récepteurs oestrogéniques positifs est, jusqu'à présent, le traitement standard internationalement reconnu depuis plus de vingt ans (Fisher et coll., 1996;1989). Ce traitement réduit l'incidence ainsi que le risque de décès avec beaucoup moins de toxicité et d'effets secondaires que tous les autres médicaments utilisés en chimiothérapie (Shin et coll., 2006). De plus, une étude à grande échelle, « The National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project » (NSABP) (n=16 000 patientes) vient d'apporter un nouvel espoir dans la lutte contre le cancer du sein, révélant que le tamoxifène pris de manière préventive pouvait réduire de moitié les risques de la maladie pour des femmes ménopausées ou non qui sont jugées particulièrement à risque de développer un cancer du sein.

Malheureusement, le tamoxifène est associé à un risque accru de cancer de l'endomètre et d'accidents thromboemboliques (Bernstein et coll., 1999; Clarke et coll., 2001). Ce risque est cependant bien inférieur aux bénéfices apportés par la réduction de la mortalité causée par le cancer du sein chez les patientes traitées. De plus, le tamoxifène a un profil agoniste au niveau de l'os chez les patientes ménopausées, ce qui lui confère un effet protecteur contre la déminéralisation osseuse (Grey et coll., 1995; Powles et coll., 1996). Cependant, chez les patientes préménopausées, la densité osseuse peut diminuer sous traitement en raison de son effet agoniste qui est inférieur à celui des œstrogènes endogènes (Osborne et coll., 1998). Par ailleurs, le tamoxifène a un effet favorable sur le métabolisme des lipides avec une réduction du cholestérol total et des LDL, mais sans

toutefois d'augmentation du HDL (Williams et coll., 1994, 1997).

1.1.2 Mode d'action du tamoxifène

Il existe 2 théories différentes qui expliquent les effets agonistes/antagonistes du tamoxifène.

La première théorie se base sur le fait que le tamoxifène exerce son activité par une inhibition compétitive au site de liaison des œstrogènes à leurs récepteurs spécifiques. Le tamoxifène se lie spécifiquement aux récepteurs oestrogéniques (RE), ces derniers se dimérisent et se lient aux éléments de réponse aux œstrogènes (ERE) sur l'ADN des cellules hormono-dépendantes. Il peut se lier aux deux isoformes de RE α et RE β . L'affinité relative du tamoxifène est identique pour les deux isoformes. Des études ont montré que le tamoxifène se comporte comme un antagoniste et un agoniste partiel quand son effet est médié par RE α , mais il se comporte comme un antagoniste pur quand son effet est médié par RE β . L'effet antiœstrogène est donc lié au contenu cellulaire en RE α et RE β libres et à la structure de l'antiœstrogène. Le tamoxifène a un effet prédominant antiœstrogénique au niveau du sein, du vagin et du système nerveux central.

La deuxième théorie explique la dualité d'effets du tamoxifène par le fait que le RE possède deux régions autonomes activatrices de la transcription : le domaine A/B de la partie N-terminale du récepteur, et le domaine E de la partie C-terminale qui lie également l'hormone. L'activité du domaine A/B est désignée TAF-1 (Transcription Activating Function), celle du domaine E est désignée TAF-2. Le tamoxifène est antagoniste de TAF-2 et agoniste de TAF-1. Dans une cellule où TAF-2 est dominant, c'est l'effet antagoniste qui s'exprimera. Par contre dans une cellule où TAF-1 est

dominant ce sera l'effet agoniste. La cellule tumorale du sein est sous la dépendance de TAF-2. En revanche les RE au niveau de l'os et ceux engagés dans le métabolisme lipidique sont plutôt dépendants du TAF-1.

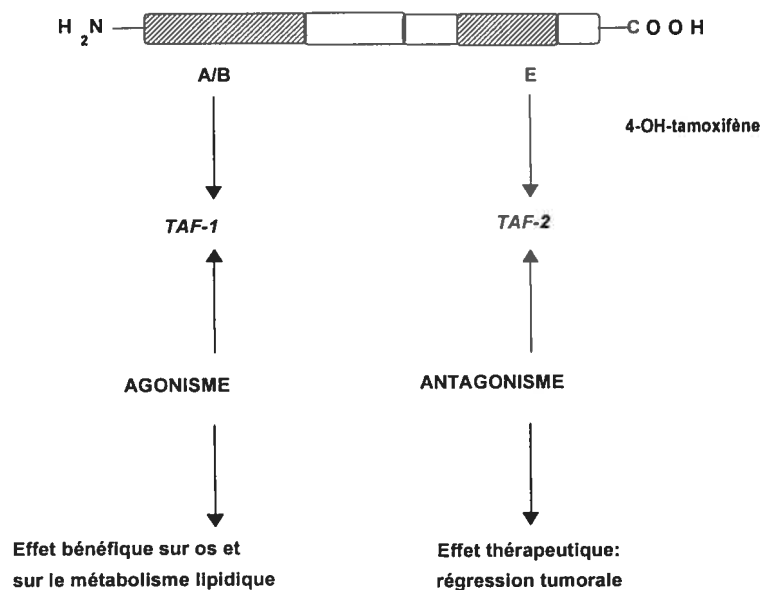


Figure 1. Effet agoniste et antagoniste du tamoxifène. Tiré de :

http://129.175.176.190/DocsTelecharges/Cancero09/anti_cancer_hormono_dep.doc

1.1.3 Pharmacocinétique du tamoxifène

Le tamoxifène est administré par voie orale, 1 à 2 fois par jour à une dose maximale de 20 à 40 mg/jour (Sunderland et coll., 1991). Il est rapidement absorbé en raison de son excellente biodisponibilité (98 à 100 %) (Langan et coll., 1988). Le tamoxifène et ses métabolites sont fortement liés à l'albumine. Le volume apparent de distribution du tamoxifène est très élevé (50-60 l/kg), ce qui suggère une distribution importante du médicament au niveau du tissu périphérique et la présence d'une portion mineure dans le

sérum (Lien et coll., 1989). Sa demi-vie est de sept jours, ainsi l'équilibre pharmacocinétique est obtenu après quatre semaines. Le tamoxifène subit un métabolisme hépatique suite à une oxydation importante par le cytochrome P450 aboutissant à de nombreux métabolites primaires et secondaires (Lonning et coll., 1992; Poon et coll., 1993; Buckley et Goa 1989). L'excrétion se fait après un cycle entérohépatique. Après l'arrêt du traitement, le produit reste présent dans l'organisme pour quatre à six semaines (Lien et coll., 1991).

1.1.3.1 Le 4-hydroxytamoxifène

Des études in vivo et in vitro réalisées chez l'humain ont permis de vérifier que le premier passage hépatique du tamoxifène résulte en une augmentation significativement importante de son activité. Ce phénomène est dû à l'apparition dans le sang du métabolite primaire du tamoxifène, le 4-hydroxytamoxifène (Jordan et coll., 1995). Le 4-hydroxytamoxifène, important métabolite du tamoxifène, est produit chez les humains par les cytochromes P450 de type 2D6, 2C9, 2E1 et 3A4 (Mani et coll., 1993; Crewe et coll., 1997). Il a été démontré que ce métabolite présente une activité pharmacologique identique à celle du tamoxifène, possède une affinité de liaison 100 fois plus élevée aux récepteurs oestrogéniques et est un antagoniste oestrogénique 30 à 100 fois plus puissant que le tamoxifène (Jordan et coll., 1977; Coezy et coll., 1982; Katzenellenbogen et coll., 1984). Par conséquent, le tamoxifène est considéré comme un pro-médicament nécessitant l'activation par hydroxylation pour exercer ses effets (Furr et Jordan, 1984; Jianying He et coll., 2003).

Pour ces raisons, le 4-hydroxytamoxifène est fréquemment plus utilisé que le tamoxifène comme composé modèle pour les études de laboratoire examinant les activités anti-oestrogéniques du tamoxifène (Lim et coll., 2006; Sarkaria et coll., 1994).

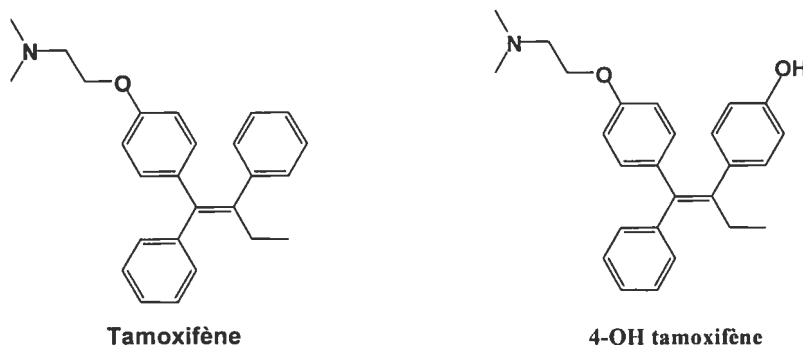


Figure 2. Structure chimique du tamoxifène et du 4-hydroxytamoxifène (Lonning et coll., 1993).

1.2 ACTIVITÉ ÉLECTRIQUE CARDIAQUE

1.2.1 Électrophysiologie et potentiel d'action

Le muscle cardiaque est un muscle de contraction involontaire. Les myocytes qui le constituent se contractent de façon rythmique et automatique. On peut donc parler de syncytium fonctionnel. Cependant le muscle cardiaque n'est pas un syncytium au sens propre. Une cellule cardiaque est une cellule qui ne possède qu'un noyau, le syncytium fonctionnel s'effectue par l'intermédiaire des canaux jonctionnels ("gap" junctions ou connexines) qui permet aux cellules de communiquer entre elles. Un cœur séparé de son organisme et convenablement perfusé peut se contracter pendant des heures : le cœur a

son propre fonctionnement : on parle d'activité intrinsèque. Cet automatisme est régulé par le système neurovégétatif.

Comme le cœur subit des dépolarisations et des repolarisations, les courants électriques générés se repercutent à travers tout le corps. Cette activité électrique peut être mesurée via des électrodes placées sur la peau. Le tracé enregistré au moyen de l'électrocardiographe est appelé l'électrocardiogramme (ECG). Les différentes vagues qui forment l'ECG représentent les séquences de dépolarisation/repolarisation des oreillettes et des ventricules. Chaque cycle de dépolarisation/repolarisation du cœur correspond au passage du courant électrique des oreillettes vers les ventricules. Sur le plan électrocardiographique, cela se traduit par l'enregistrement toujours dans le même ordre de différentes ondes : P, Q, R, S, T.

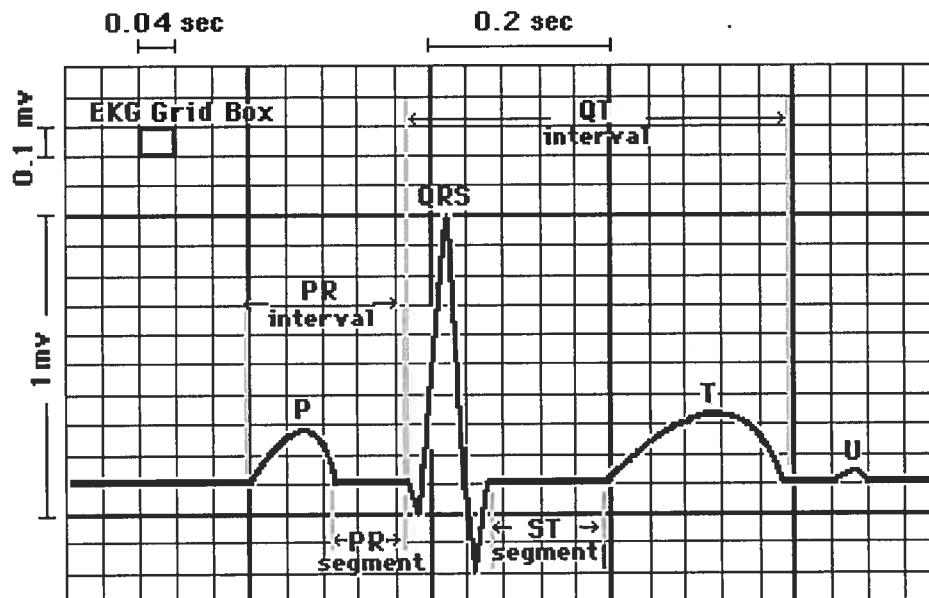


Figure 3. Terminologie de l'électrocardiographie chez l'humain.

Tiré de : http://cal.vet.upenn.edu/lgcardiac/ecg_tutorial/qrsinterval.htm

La première onde, l'onde P, est d'une durée de 0.08 seconde et elle correspond à la dépolarisation des oreillettes depuis le nœud sinusal vers le nœud atrio-ventriculaire. C'est une onde de faible amplitude parfois diphasique. Le rythme physiologique est dit sinusal. Dans ce cas, les ondes P auriculaires précèdent régulièrement les complexes ventriculaires QRS. Le segment PR est un court segment isoélectrique qui sépare l'onde P du complexe ventriculaire (QRS). La repolarisation auriculaire n'est pas visible sur l'ECG normal car elle se produit pendant la repolarisation ventriculaire. Comme l'onde de repolarisation des oreillettes est relativement faible en amplitude, elle est alors masquée par le complexe QRS généré par les ventricules. L'intervalle PR correspond au

temps de conduction auriculo-ventriculaire. C'est le temps nécessaire à l'influx pour dépolariser les oreillettes puis franchir le nœud auriculo-ventriculaire et le tronc du faisceau de His. Il se mesure à partir du début de l'onde P en allant jusqu'au début du QRS et il est de 0.12 à 0.23 seconde. Le complexe QRS est formé des trois ondes Q, R et S. Il correspond à la dépolarisation ventriculaire et précède la contraction des ventricules. Sa durée est régie par la vitesse de conduction de l'influx cardiaque à travers le myocarde; ce complexe dure normalement 0.08 seconde. Cette durée très courte indique que la dépolarisation ventriculaire apparaît normalement très rapidement. Si la durée du complexe QRS est prolongée alors la conduction est altérée à l'intérieur des ventricules. L'onde T reflète la repolarisation ventriculaire et est plus longue en durée que la dépolarisation; cette onde succède au complexe QRS après retour à la ligne isoélectrique. Sa durée moyenne est de 0.16 seconde. L'intervalle QT (0.36 seconde) relevé sur un ECG correspond au temps nécessaire à la repolarisation ventriculaire, et représente donc la durée du potentiel d'action cardiaque. Par conséquent, une augmentation de l'intervalle QT signale une anomalie au niveau de la repolarisation cardiaque, qui peut aller jusqu'à provoquer des arythmies létales. Comme l'intervalle QT est l'indice de la repolarisation des cellules du myocarde ventriculaire, ce paramètre fera l'objet d'une attention particulière dans ce mémoire.

Le potentiel membranaire de repos des cellules ventriculaires est élevé, de l'ordre de -90 mVolts (mV). Au cours de la dépolarisation des cellules contractiles cardiaques, le potentiel de la membrane plasmique passe rapidement de son potentiel de repos au potentiel d'action. Un potentiel d'action est une brève inversion du potentiel membranaire, qui résulte en une dépolarisation d'une durée approximative de 200 ms

chez l'homme et de 20-30 ms chez la souris. Plusieurs types de canaux et de pompes/échangeurs ioniques spécifiques engendrent des événements ordonnés depuis le nœud sinusal jusqu'au potentiel d'action cardiaque ventriculaire final.

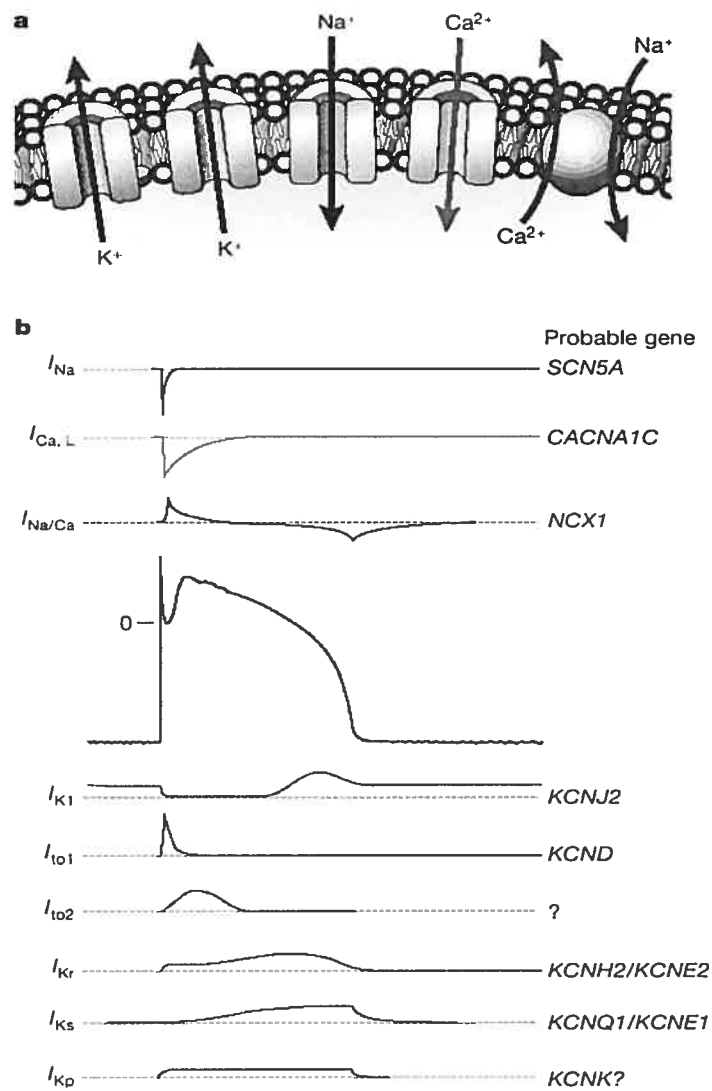


Figure 4a et 4b Relation entre les canaux ioniques, les courants et les gènes correspondants. Tiré de :

http://www.unil.ch/webdav/site/dpt/shared/BachelorMaster/PPP_cardiovasculaire_7e_semestre_1.ppt#16

Un potentiel d'action typique comprend quatre phases composées de courants entrants et sortants (Na^+ , Ca^{2+} , K^+) correspondant aux phases de dépolarisation et de repolarisation cardiaque. La durée du potentiel d'action est donc déterminée par la balance nette entre les courants entrants et sortants. Le potentiel de repos est contrôlé par le gradient électrochimique d'ions potassium. La phase 0 rapide du potentiel d'action est le résultat d'une entrée massive d'ions sodium dans la cellule et les trois phases (1,2 et 3) de repolarisation sont associées à une entrée d'ions calcium et une sortie d'ions potassium. Les caractéristiques du potentiel d'action permettent de comprendre la morphologie de l'ECG de surface. Ce dernier étant le reflet de la somme des courants extracellulaires générés par les différences de potentiel de chaque cellule myocardique. Lors de la phase 0 du potentiel d'action, les canaux sodiques se trouvent dans une configuration ouverte due à un changement du potentiel de repos de la membrane plasmique, laissant les ions Na^+ à partir de l'espace extracellulaire vers le cytoplasme: c'est la phase de dépolarisation ou la phase ascendante du potentiel d'action. Durant cette phase, l'entrée accrue des ions sodiques a pour effet d'inverser le potentiel membranaire de repos de -90 mV à +30 mV. Cette période est très brève car l'inactivation des canaux sodiques s'affectue en moins de 20 ms. Une phase rapide de repolarisation du potentiel d'action cardiaque s'ensuit (phase 1), liée à l'ouverture transitoire de courants K^+ transitoires sortant indépendant du Ca^{2+} (I_{to}). Elle précède la phase du plateau. La phase 2 est caractérisée par un plateau reflétant l'équilibre entre courants calciques entrants et les courants potassiques sortants. La transition de l'onde de dépolarisation dans les tubules T amène le réticulum sarcoplasmique à libérer du calcium dans le cytoplasme. Le calcium ionique sert à l'activation de la contraction du muscle cardiaque grâce à l'activation du

complexe myosine-actine. Ultérieurement la fermeture des canaux calciques et sodiques et l'ouverture des canaux potassiques aboutissent à la diffusion des ions potassium vers l'extérieur de la cellule et engendre la phase 3 ou la phase de la repolarisation cellulaire. La phase finale de repolarisation est assurée par la sortie d'ions K^+ due au courant à rectification entrante (I_{K1}). Lorsque la repolarisation est complète et la membrane cytoplasmique revient à son potentiel de repos avant que ne débute une autre dépolarisation. C'est la phase 4 du potentiel d'action. Ainsi, le potentiel d'action est le résultat d'un équilibre délicat entre les courants ioniques entrants (Na^+ et Ca^{2+}) et les courants ioniques K^+ sortants. Le moindre déséquilibre entre ces courants perturbe le phénomène de repolarisation cellulaire, et le cœur devient alors plus susceptible au développement d'arythmies cardiaques. Différents canaux potassiques peuvent contribuer à la repolarisation des cellules cardiaques et ainsi moduler la durée du potentiel d'action cardiaque. Les canaux dont le rôle est le plus important dans la repolarisation des cellules myocardiques sont ceux qui transfèrent le potassium de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule. Cela explique pourquoi une diminution de la densité ou une inhibition de ces courants ou des canaux correspondants mène à une prolongation du potentiel d'action et de l'intervalle QT de l'ECG qui en fait peut provoquer des arythmies qui en retour peuvent conduire au syndrome de mort subite cardiaque.

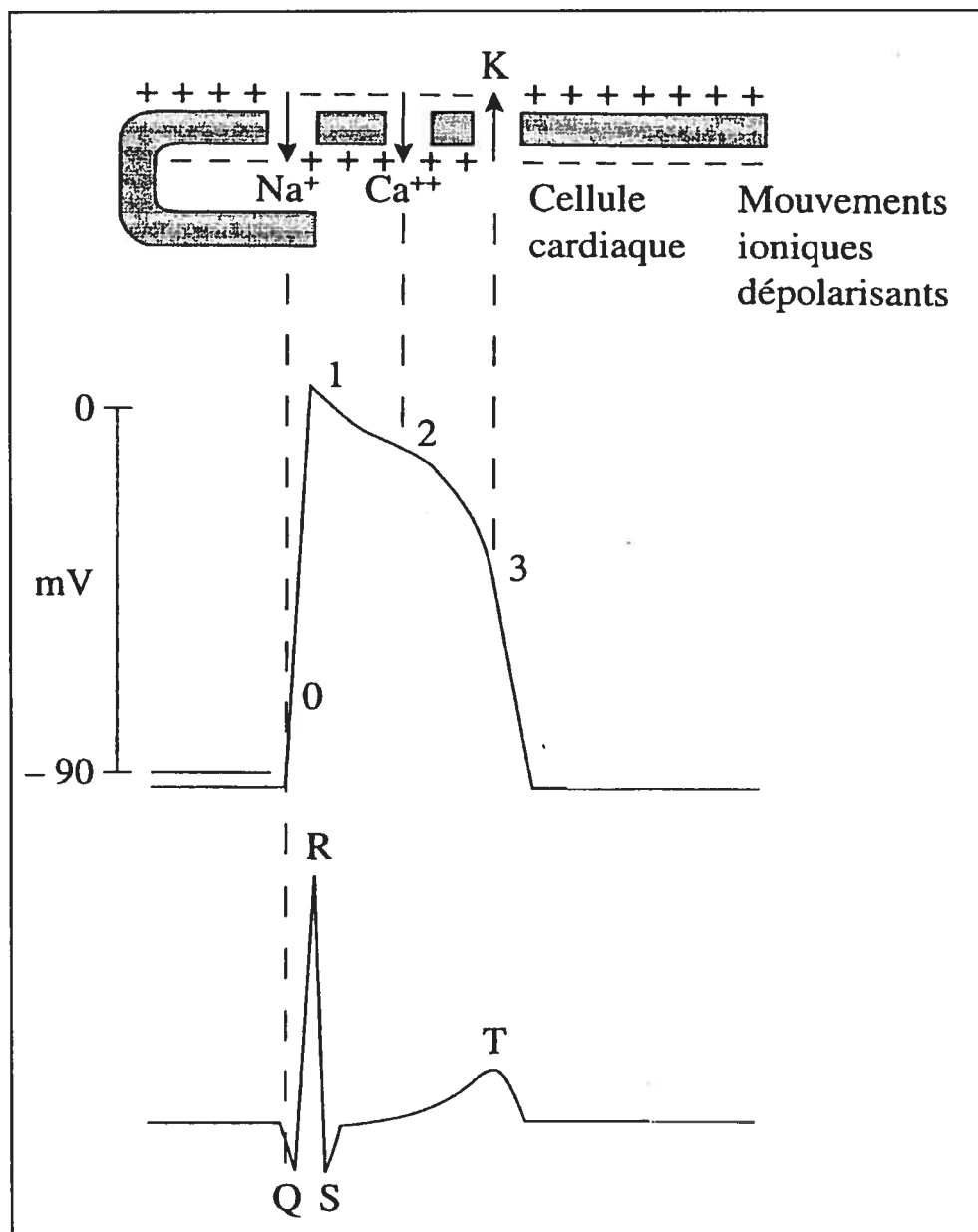


Figure 5. Corrélation entre les mouvements ioniques transmembranaires, le potentiel d'action et l'ECG. Tiré de : Les arythmies cardiaques un guide clinique et thérapeutique, 4^e édition, Éditions Gaëtan Morin, 1998

1.3 DÉRÈGLEMENT DE LA REPOLARISATION

1.3.1 Allongement de l'intervalle QT et Torsades de pointes

La “ torsade de pointes ” est une arythmie cardiaque de la catégorie des tachycardies ventriculaires. Elle peut se manifester par une syncope et se termine fréquemment de façon spontanée. Par contre, elle peut dégénérer en fibrillation ventriculaire et entraîner la mort. Les données recueillies jusqu'à ce jour indiquent que les torsades de pointes seraient initiées par des dépolarisations précoces (« early after depolarisations », EAD) (Lu HR et coll., 2006; Ravina et coll., 2006; Lankipalli et coll., 2005). Il semble que le courant Ca^{2+} de type L (I_{CaL}) soit le candidat responsable de ces dépolarisations précoces. Cliniquement une torsade de pointes peut être asymptomatique (si sa durée est brève), entraîner un ou plusieurs malaises syncopaux ou convulsifs si le trouble du rythme est persistant et répétitif, ou enfin se traduire d'emblée, ou après un ou plusieurs épisodes symptomatiques, par une mort subite. Les caractéristiques électrocardiographiques de la torsade de pointes comportent : 1) un trouble du rythme ventriculaire rapide; 2) en dehors des épisodes de torsade, lorsque le rythme cardiaque est redevenu normal : un intervalle QT allongé. Cet intervalle QT se raccourcit physiologiquement lorsque la fréquence cardiaque s'accélère et s'allonge lorsqu'elle se ralentit. Une prolongation de l'intervalle QT reflète un retard de repolarisation cardiaque et augmente aussi la probabilité de développement de torsade de pointes. Pour tenir compte des variations de l'intervalle QT avec la fréquence cardiaque, celui-ci est corrigé en fonction de la fréquence cardiaque à laquelle il est mesuré, afin de le normaliser pour une fréquence cardiaque de 60 battements par minute. La valeur ainsi obtenue représente le QT corrigé (QTc). A titre d'information, les valeurs normales du QTc ne doivent pas excéder 430 ms chez l'homme

et 450 ms chez la femme. L'hypothèse la plus plausible expliquant la présence des torsades de pointes est que ces arythmies sont liées à l'apparition, au niveau des cellules du myocarde ventriculaire, de post-dépolarisations précoces se propageant au sein d'un myocarde ventriculaire dont la repolarisation est prolongée de façon hétérogène (Lu HR et coll., 2006; Joshi et coll., 2004; Lankipalli et coll., 2005). Ceci est surtout observé en cas des mutations géniques ou lors d'utilisation des médicaments (les antibiotiques) capables d'inhiber des courants ioniques responsables de la repolarisation.

Selon Kunkler et coll., (2002) il existe de nombreux facteurs de risque de torsade de pointes :

- (1) un intervalle QTc allongé pouvant traduire un syndrome du QT long congénital,
- (2) une cardiopathie préexistante (troubles graves du rythme ventriculaire, bloc auriculo-ventriculaire, trouble de la conduction intraventriculaire, insuffisance cardiaque),
- (3) Des troubles hydroélectrolytiques (comme une hypomagnésémie, une hypocalcémie et une hypokaliémie),
- (4) une bradycardie (constitutionnelle ou acquise) inférieure à 55-60 battements par minute,
- (5) des concentrations plasmatiques élevées de médicaments torsadogènes en cas d'intervalle QT long acquis (dus à une inhibition du métabolisme du médicament, une insuffisance rénale, une insuffisance hépatique, un surdosage etc...),
- (6) une association de médicaments potentiellement torsadogènes,
- (7) une hypothyroïdie.

1.3.2 Le syndrome du Long QT (LQT) acquis

Il est maintenant bien documenté que les femmes sont plus susceptibles de développer des torsades de pointes que les hommes. En effet, les femmes ont trois fois plus de risque de développer cette arythmie que les hommes (Lehmann et coll., 1996). Une explication fort plausible de la prédisposition des femmes à développer des torsades de pointes est le fait que leur intervalle QTc basal soit plus long que celui des hommes. Cette différence de 10 à 20 ms selon les études a été notée pour la première fois par Bazett, en 1920, et a été confirmée par la suite par plusieurs chercheurs (Lehmann et coll., 1997; Rautaharju et coll., 1992).

Deux types de syndromes du QT long peuvent déclencher des torsades de pointes:

1. Le syndrome du LQT congénital

Le syndrome du LQT congénital est lié à une anomalie de fonctionnement génétiquement déterminée de canaux potassiques, mais aussi sodiques et calciques, au niveau du cœur (Bezzina CR. et coll., 2005). Dans le syndrome du long QT congénital, huit mutations sur des gènes codant pour un canal sodique, et surtout des canaux potassiques cardiaques, ont été identifiées. Le plus souvent le syndrome du long QT congénital se révèle précocement chez des sujets jeunes par des manifestations cliniques graves et récidivantes. Certaines formes, dites frustes, peuvent passer totalement inaperçues et n'être révélées que tardivement, notamment par la prise occasionnelle d'un médicament allongeant l'intervalle QT.

2. Le syndrome du LQT acquis

Le syndrome du LQT acquis principalement d'origine médicamenteuse, est occasionné par l'inhibition des canaux potassiques cardiaques par certains médicaments. L'induction d'arythmies à la suite de la prolongation de l'intervalle QTc par les médicaments est relativement rare mais d'une extrême gravité.

Il ya deux différentes classifications de ces médicaments :

1. Première classification

Cette classification divise les médicaments en quatre groupes, étant donné que le risque d'induire des torsades de pointes n'est pas le même pour les différents médicaments:

- LISTE 1 :Médicaments dont on est sûr à 100% qu'ils peuvent causer des torsades de pointes. Ex : bépridil, disopyramide, dofétilide, ibutilide, procaïnamide, sotalol.
- LISTE 2 :Médicaments qui ont été associés à des torsades de pointes mais dont on manque de preuves cliniques pour être sûr à 100%. Ex : amantadine, flécainide, indapamide, nicardipine, **tamoxifène**.
- LISTE 3 : Médicaments qu'il faut éviter pour les personnes chez qui on a diagnostiqué ou chez qui on soupçonne un syndrome de LQT congénital ou médicamenteux. (Les médicaments de la liste 1 et 2 sont aussi inclus ici). Ex : amiodarone, chloroquine, dompéridone, imipramine, terbutaline.
- LISTE 4 : Médicaments qui ont été quelquefois associés à des torsades de

pointes, mais qui présentent un risque important en cas du surdosage.

Ex :amitriptyline, dopamine, sertraline, méxilétine.

2. Deuxième classification

Cette classification divise les médicaments en trois groupes :

- Les médicaments torsadogènes ayant la propriété pharmacologique d'allonger l'intervalle QT, retenus par le Groupe de Travail des Interactions Médicamenteuses de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé « AFSSAPS » sont les suivants :
 - Antiarythmiques de classe Ia : ce sont la quinidine, l'hydroquinidine et le disopyramide. Outre leur effet sur les canaux sodiques voltage-dépendants, ils ralentissent la vitesse de repolarisation en inhibant la sortie du potassium. Ceci se manifeste au niveau de l'ECG par une prolongation du complexe QRS et de l'intervalle QT et donc peuvent être à l'origine de torsades de pointes.
 - Antiarythmiques de classe III : ce sont des inhibiteurs des canaux K^+ qui prolongent la durée du potentiel d'action empêchant ainsi la formation de circuits de réentrée de la repolarisation cardiaque, pouvant mener à la formation de torsade de pointes. Dans cette classe, on trouve le sotalol, l'ibutilide et l'amiodarone. Pour le sotalol: des torsades de pointes ont été observées lors de son utilisation chez des patients en hypokaliémie. Ces torsades de pointes sont liées à une augmentation de l'intervalle QT. Pour l'ibutilide et l'amiodarone, même s'ils appartiennent à une classe médicamenteuse qui augmente la durée du potentiel d'action, ils sont cependant peu arythmogènes.

- Les antidépresseurs tricycliques peuvent allonger les intervalles PR, QRS et QT et diminuer l'amplitude ou inverser l'onde T; des cas de torsade de pointes sont décrits en cas de surdosage.
 - autres : certains neuroleptiques, cisapride, halofantrine, trioxide d'arsenic et macrolides.
- Dans la mesure où l'hypokaliémie et la bradycardie sont des facteurs favorisant la survenue de torsade de pointes, une précaution d'usage apparaît systématiquement entre les médicaments bradycardisants ou hypokaliémisants torsadogènes. Les médicaments hypokaliémisants sont représentés par les diurétiques hypokaliémisants, les laxatifs stimulants, l'amphotéricine B et les glucocorticoïdes. Les médicaments bradycardisants comprennent les antagonistes calciques bradycardisants (diltiazem, vérapamil), les bêtabloquants, la clonidine, la guanfacine et les digitaliques. L'association d'un médicament torsadogène et d'un médicament bradycardisant nécessite une précaution d'usage qui consiste en une surveillance clinique, électrolytique et électrocardiographique du patient.
 - Les inhibiteurs enzymatiques, principalement les inhibiteurs du CYP 3A4, sont susceptibles de potentialiser les effets de certains médicaments torsadogènes en inhibant leur métabolisme et donc en augmentant leur concentration plasmatique. Ceci est particulièrement vrai pour le buprénorphine, le cisapride et le disopyramide.

1.4 PROBLÉMATIQUE

De tous les SERMs présentement disponibles sur le marché, le tamoxifène est le médicament le plus utilisé dans la prévention et le traitement hormonal adjuvant de première intention des cancers du sein hormono-dépendants depuis plus de 20 ans (Ward et coll., 2003). Des études ont rapporté que l'administration aiguë du tamoxifène ou de son métabolite actif, le 4-hydroxytamoxifène, pouvait réduire certains courants ioniques cardiaques (Diaz et coll., 2002, Best et coll., 2002). En fait, il a été rapporté que le tamoxifène inhibe les courants chlorures dans différents types cellulaires et les courants calciques voltage-dépendants ainsi que la contractilité au niveau des cellules musculaires lisses chez le rat (Song et coll., 1996). Une étude de Ward et coll., (2003) a rapporté qu'un traitement à court terme avec le tamoxifène inhibe les courants sodiques et potassiques chez le rat. Un autre groupe a démontré que le courant K^+ "ether-a-go-go-related gene" (HERG) est inhibé par le tamoxifène et cette inhibition est responsable du syndrome du LQT2 (Thomas et coll., 2003). De plus, Liu et coll., ont montré que le tamoxifène inhibe le courant K^+ à rectification retardée à activation rapide (I_{Kr}) et le courant calcique de type L (I_{Ca-L}) au niveau des myocytes ventriculaires du lapin mais aucun effet sur le courant K^+ à rectification entrante (I_{K1}) et le courant K^+ transitoire sortant indépendant du calcium (I_{to}) n'a été observé. Bien qu'il ait été rapporté que le tamoxifène et le 4-hydroxytamoxifène peuvent inhiber des courants ioniques des myocytes cardiaques isolées, il n'y a pas d'association entre le tamoxifène et la présence d'arythmies. De même, il a été rapporté que le tamoxifène peut être à l'origine d'une prolongation asymptotique de l'intervalle QT selon Trump et coll.(1992). Ce groupe a démontré que le tamoxifène peut prolonger la repolarisation cardiaque et induire une

augmentation asymptomatique de l'intervalle QT de l'ECG suggérant ainsi un effet du tamoxifène sur la repolarisation cardiaque. Tel que mentionné précédemment, le tamoxifène est classé dans la liste 2 des médicaments qui ont été parfois associés à des torsades de pointes. Si cette allégation concernant l'association entre le tamoxifène et un retard de repolarisation était réelle, ceci signifierait qu'un grand nombre de patientes risquerait de développer des torsades de pointes.

D'autre part, même si l'étude fait par Liu et coll. a montré une inhibition importante de I_{Kr} par le tamoxifène, cette inhibition ne semblait pas prolonger la durée du potentiel d'action. Ce résultat inconsistant avec l'inhibition de I_{Kr} , contredit les prolongations de QT observées dans l'étude clinique de Trump et coll.(1992).

Selon l'étude de Trump et coll.(1992), les patients atteints de différents types de cancer ont été traités avec du tamoxifène associé à la vinblastine. Pendant le traitement, des enregistrements des ECG des patients ont démontré une prolongation de l'intervalle QT. Cette prolongation fut en fait observée quand la concentration plasmatique du tamoxifène était de 5 μM soit 6.6 fois plus élevée que celle obtenue avec les posologies utilisées internationalement (20-40 mg/j) pendant un traitement chronique du cancer du sein. D'un autre côté, dans cette étude, les critères d'inclusion et d'exclusion ne sont pas bien définis et les antécédents d'hypersensibilité au tamoxifène ou à la vinblastine ou même à un médicament de structure analogue des patients ne sont pas précisés. De plus, le portrait clinique est incomplet et le profil pharmacologique des sujets n'est pas bien décrit. En comparant cette étude avec d'autres études cliniques on trouve que celle-ci ne permet pas de conclure que le tamoxifène peut causer des torsades de pointes. Nous concluons que même si le tamoxifène est classé dans la liste 2 des médicaments qui ont été associés à

des torsades de pointes ou à éviter chez des personnes à risque, ceci nécessite encore des données expérimentales supplémentaires pour tirer une telle conclusion. Effectivement, utilisé en clinique depuis une vingtaine d'années le tamoxifène ne semble avoir causé aucun cas d'arythmies cardiaques et de torsades de pointes chez les femmes traitées à long terme pour le cancer du sein. Cette constatation suggère qu'il existe sans doute des mécanismes compensatoires expliquant la contradiction des effets à long et à court terme du tamoxifène. Les principales raisons qui nous ont motivées à réaliser cette étude sont les suivantes :

1. Certaines drogues inhibant les courants K^+ cardiaques et prolongeant la durée du potentiel d'action peuvent causer le syndrome du LQT et induire des arythmies ventriculaires.
2. La capacité du tamoxifène à inhiber certains types de courants ioniques.
3. L'absence des troubles du rythme cardiaque lors d'un traitement à long terme avec le tamoxifène.

1.5 OBJECTIFS SPÉCIFIQUES DE L'ÉTUDE

L'inhibition de certains courants potassiques observée suite à l'administration aiguë du tamoxifène ou du 4-hydroxytamoxifène dans les différentes études, permet d'élaborer l'hypothèse qu'une prise de tamoxifène peut retarder la repolarisation cardiaque, prolonger la durée du potentiel d'action et donc induire une augmentation de l'intervalle QT de l'ECG potentialisant par la suite le risque de développement des torsades de pointes. Or, jusqu'à maintenant et même si le tamoxifène est considéré dans la littérature

comme un médicament susceptible de développer des torsades de pointes, aucun cas de torsades de pointes n'a été rapporté chez les femmes sous traitement chronique de tamoxifène (~ 5 ans). L'objectif de ce projet de maîtrise était donc de comparer l'effet d'un traitement aigu versus chronique du tamoxifène sur les courants K^+ présents au niveau des myocytes ventriculaires de souris: le courant K^+ transitoire sortant indépendant du Ca^{2+} (I_{to}), le courant K^+ transitoire sortant à rectification retardée ultrarapide (I_{Kur}), le courant K^+ transitoire sortant à l'équilibre (I_{ss}) et le courant K^+ à rectification entrante (I_{K1}). Pour l'étude de traitement aigu, les courants K^+ sont enregistrés par la méthode de patch-clamp avant et après perfusion directe des cellules ventriculaires pendant 30 minutes avec différentes concentrations de 4-hydroxytamoxifène. Pour l'étude chronique, afin de déterminer si l'exposition à long terme au tamoxifène affectait aussi les courants K^+ , des souris femelles (CTL) ont été utilisées. Ces souris ont été traitées avec du tamoxifène (implants sous-cutanés libérant 5 mg sur 60 jours). Après 60 jours de traitement, les courants K^+ ainsi que les potentiels d'action ont été mesurés sur les myocytes isolées des ventricules de souris. Les résultats obtenus indiquent une diminution des courants K^+ après un traitement aigu au tamoxifène et une augmentation de ces courants après un traitement chronique.

2 MÉTHODES

2.1 Isolation des myocytes ventriculaires

Des souris CD1 femelles (2-3 mois, 25-30g) ont été héparinées, anesthésiées par inhalation d'isofurane puis sacrifiées par dislocation cervicale. Les cœurs ont été rapidement enlevés, puis directement perfusés par l'aorte avec les solutions suivantes: (i) avec du tyrode contenant (en mM): 130 NaCl; 5.4 KCl; 1CaCl₂ ; 1 MgCl₂; 0.33 Na₂HPO₄; 10 HEPES; 5.5 glucose (pH ajusté au 7.4 avec du NaOH) pendant 5 minutes, (ii) avec du tyrode sans Ca²⁺ pendant 10 minutes; (iii) avec du tyrode contenant 73.7 U/ml de collagénase type 2; 0.1% albumine bovine sérum (BSA); 20 mM taurine et 30μM CaCl₂ pendant 20-25 minutes, et enfin (iv) avec de la solution KB contenant en (mM): 100 K-glutamate; 10 K-aspartate; 25 KCl; 10 KH₂PO₄; 2 MgSO₄; 20 taurine; 5 créatine; 0.5 EGTA; 5 HEPES; 0.1% BSA; 20 glucose (PH ajusté au 7.2 avec du KOH) pendant 5 minutes 30. Durant la perfusion les solutions sont maintenues à 37 ± 1°C. A la fin de la perfusion, les cœurs sont retirés de la canule et les myocytes ventriculaires droits sont isolées suite à la trituration du ventricule droit et stockés dans de la solution KB à 4°C.

2.2 Enregistrements électrophysiologiques

Un aliquot de solution contenant les myocytes est placé dans un bain sur un microscope. Les cellules sont continuellement perfusées avec du tyrode contenant 1 mM du Ca²⁺ et oxygénées avec de l'oxygène 100%. Les courants ioniques ainsi que les potentiels d'action sont enregistrés par la méthode de patch-clamp. Cette méthode consiste à détecter les courants qui traversent la cellule à travers des canaux ioniques en utilisant

une électrode mise à la terre qui baigne dans une solution (Tyrode) et une électrode intracellulaire. Cette dernière est constituée d'un filament d'Ag/AgCl localisé dans une pipette en borosilicate (WPI, Sarasota, FL., USA, OD : 1 mm; ID :0.75 mm) dont la résistance varie entre 2 et 4 M Ω . Pour accéder à l'intérieur de la cellule, la pipette est placée directement à sa surface, jusqu'à l'obtention d'un contact étroit ("seal") avec la membrane puis la membrane sous la pipette est brisée par suction. L'électrode est connectée à un amplificateur Axopatch 200 B (Axon Instruments, Foster City, USA) qui maintient le courant (ou le voltage) constant dans la cellule. Ce qui est enregistré correspond au changement de courant (ou de voltage) nécessaire au maintien du voltage (ou du courant) constant et à la compensation par les ions traversant la membrane. La compensation de la résistance en série est fixée entre 80 et 90% et avant de commencer chaque expérience, le niveau du courant zéro est ajusté avec l'oscilloscope. Tous les courants enregistrés en mode "voltage-clamp" sont filtrés à 1 kHz. Les données sont enregistrées en utilisant le système d'acquisition «pClamp 8.0» et le programme «Clampex 8.0» et elles sont analysées par le programme «Clampfit 8.0» (Axon Instruments, Foster City, USA). Clampex est aussi utilisé pour générer les protocoles enregistrés en mode courant-imposé. Pour tenir compte de la taille des cellules, l'amplitude des courants est normalisée par la capacitance cellulaire et elle est exprimée en densité de courant (pA/pF). Dans l'étude aiguë, les courants K⁺ sont enregistrés par la méthode de patch-clamp avant et après perfusion directe de ces cellules ventriculaires pendant 30 minutes avec différentes concentrations de 4-hydroxytamoxifène (0.5, 1 et 10 μ M). Ensuite, afin de déterminer si l'exposition à long terme au tamoxifène affectait aussi les courants K⁺, des souris femelles (CTL) ont été utilisées. Ces souris ont été

traitées avec des implants sous-cutanés du tamoxifène. Ces implants sont achetés chez “ Innovative Research of America ” libérant 5 mg sur 60 jours. A la fin du traitement, les courants K^+ ainsi que les potentiels d'action ont été mesurés. Les potentiels d'action sont obtenus par la technique du patch-clamp en configuration «whole-cell» mais en mode «current-clamp». On impose un courant de 0.4-0.7 nA pendant une durée brève de 1-3 ms. Les potentiels d'action sont mesurés à 20, 50 et 90% de repolarisation chez les myocytes ventriculaires de souris femelles adultes.

2.3 Courbes courant-voltage ($I-V$)

Les courbes moyennes courant-voltage pour le courant K^+ total (I_{peak}), I_{to} , I_{Kur} , I_{ss} , et I_{K1} sont obtenues à partir des courants enregistrés suite à un voltage imposé chacun d'une durée de 500 ms allant de -110 mV à +50 mV avec des sauts de +10 mV. Le voltage de la cellule a été maintenu à -80 mV. I_{to} étant la différence entre le courant total enregistré sans et avec prépulse. I_{Kur} est calculé en faisant la soustraction des courants obtenus avec prépulse avant et après application de 100 μ M de 4-aminopyridine (4-AP). Le courant enregistré en présence de 4-AP correspond à I_{ss} . I_{K1} est mesuré à la fin de la stimulation. Tous les enregistrements sont obtenus à la fréquence de 0.1 Hz.

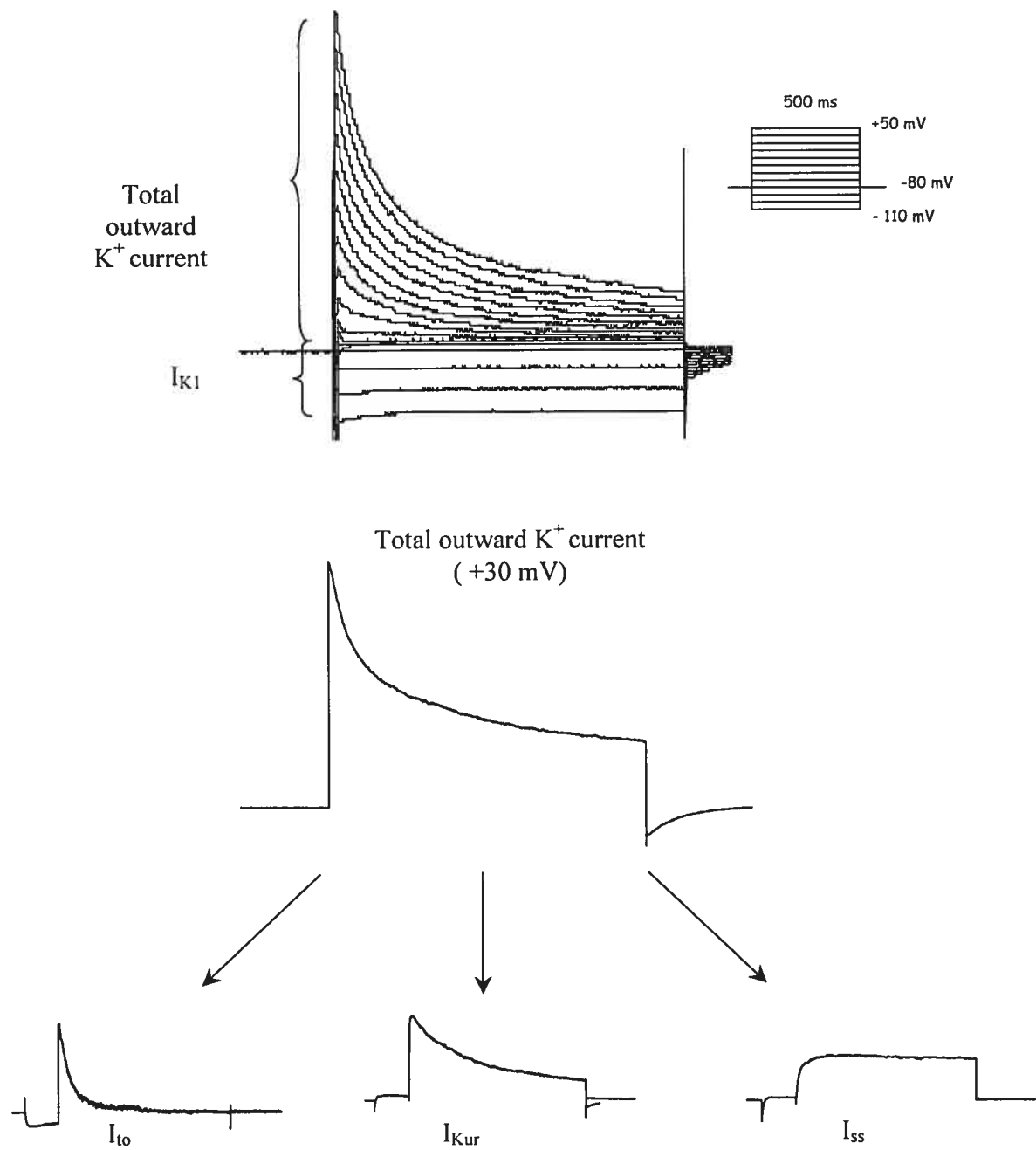


Figure 6. La séparation des courants potassiques. Tiré de : Brouillette et coll., 2004

2.4 Inactivation à l'équilibre de I_{Kur}

Pour voir si l'inactivation de I_{Kur} dépend de la valeur du potentiel membranaire, on a utilisé un protocole en mode «voltage-clamp». Le degré d'inactivation est déterminé à partir du maximum de courant enregistré lors d'une dépolarisation test constante (2.5 secondes à +50 mV) mais précédée d'un pré-test d'une durée de 5 secondes et appliqué entre -100 et +10 mV avec des sauts de +10 mV et pour une fréquence de 0.1 Hz. En plus, un pulse à -40 mV et pour une durée de 100 ms est interposé entre les 2 stimulations afin d'inactiver I_{to} . L'amplitude du courant générée après chaque pré-test est normalisée par l'amplitude maximale du courant (I/I_{max}). Puis, on effectue un lissage de courbe selon l'équation de Boltzmann : $I/I_{max} = 1/[1 + \exp((V_m - V_{1/2})/K)]$. $V_{1/2}$ représente le potentiel membranaire (V_m) au moment où 50% des courants sont inactivés et K correspond au «mid-point slope factor».

2.5 Recouvrement de l'inactivation de I_{Kur}

La réactivation du courant I_{Kur} est étudiée par la technique de patch-clamp en configuration «whole-cell». Le protocole consiste en deux dépolarisations (test 1 et test 2) d'amplitude constante et appliquées à +30 mV chaque 10 secondes. Ces deux stimulations sont séparées par un intervalle de temps variable allant de 30 à 1600 ms. Le potentiel membranaire étant de -80 mV. Ces deux tests sont précédés d'un pré-pulse de 100 ms à -40 mV pour inactiver I_{to} . Lorsque l'intervalle de temps séparant les deux tests est très court, aucun courant I_{Kur} n'est observable lors du second test. Durant ce très court intervalle, le canal n'est pas encore sorti de son état inactivé. En augmentant progressivement l'intervalle de temps entre les deux tests, on constate que le courant I_{Kur}

est restauré au cours du second test et que son intensité au maximum s'accroît avec la durée de l'intervalle de temps. Le canal responsable du courant I_{Kur} peut donc sortir progressivement de son état inactivé pour redevenir activable, dès lors qu'une repolarisation de la membrane se produit. C'est le principe de la réactivation du courant. On représente le rapport courant obtenu lors de la deuxième stimulation divisé par le courant obtenu lors de la première stimulation en fonction du temps séparant les deux stimulations. Puis on fait un lissage de cette courbe avec une exponentielle qui permet de déterminer la constante de temps de recouvrement pour pouvoir stimuler tous les canaux.

3 RÉSULTATS

3.1 ÉTUDE AIGUË

Afin de caractériser l'inhibition de I_{Peak} par le 4-hydroxytamoxifène, nous avons examiné si cette inhibition est dépendante du temps. I_{Peak} a été enregistré avant et après chaque 2 minutes de perfusion avec 10 μM de 4-hydroxytamoxifène. Le temps total d'enregistrement est de 30 minutes. Les résultats de cette expérience révèlent que l'inhibition maximale de I_{Peak} par le 4-hydroxytamoxifène est dépendante du temps et il n'y a pas d'effet significatif après 25 minutes de perfusion. Tous les enregistrements bruts présentés dans ce projet sont obtenus après 30 minutes d'application de la drogue afin d'être sûr que l'effet maximal est atteint.

3.1.1 Effet du 4-hydroxytamoxifène sur le potentiel d'action chez la souris

Une caractérisation complète du potentiel d'action à des concentrations de 0.5, 1 et 10 μM de 4-hydroxytamoxifène était impossible, car ces concentrations suppriment complètement notre aptitude à stimuler les potentiels d'action. Ces concentrations utilisées correspondent aux concentrations thérapeutiques sanguines de 4-hydroxytamoxifène obtenues lors d'un traitement chronique au tamoxifène. Des expériences précédentes faites dans notre laboratoire ont démontré que le véhicule seul (l'éthanol) n'affecte pas significativement les potentiels d'action.

3.1.2 Effet du 4-hydroxytamoxifène sur les courants potassiques

Chez la souris femelle adulte, différents courants potassiques sont responsables de la repolarisation cardiaque. Le courant total est représenté par I_{peak} et il est formé de deux

portions. La portion sortante, qui elle, est formée de 3 courants : I_{to} , I_{Kur} , I_{ss} et la portion entrante qui comprend I_{K1} . Ces courants sont enregistrés avant et après 30 minutes de perfusion avec du 0.5, 1 et 10 μ M 4-hydroxytamoxifène en utilisant la technique du “patch-clamp” en mode cellule entière.

3.1.2.1 Effet du 4-hydroxytamoxifène sur I_{peak}

Les histogrammes présentés dans la figure 7 montrent que à +30 mV, l'application aiguë des trois concentrations de 4-hydroxytamoxifène (0.5, 1 et 10 μ M) diminue significativement I_{peak} et que cette diminution est dépendante de la concentration du tamoxifène. Les enregistrements bruts illustrés dans la figure 8a montrent I_{peak} avant et après perfusion avec 10 μ M de 4-hydroxytamoxifène. À partir d'une densité moyenne de I_{peak} à +30 mV de 63.67 ± 4.4 pA/pF, 62.92 ± 6.95 pA/pF et 61.35 ± 5.10 pA/pF, une addition de 4-hydroxytamoxifène diminue I_{peak} , à 49.35 ± 5.4 pA/pF ($n=9$; $p<0.05$), 45.83 ± 5.48 pA/pF ($n=10$; $p<0.05$) et 38.23 ± 4.15 pA/pF ($n=12$; $p<0.05$), pour 0.5, 1 et 10 μ M respectivement. Cette réduction est illustrée aussi dans la courbe courant-voltage où on peut voir clairement que la portion entrante et la portion sortante de I_{peak} sont réduites après application du 4-hydroxytamoxifène (Figure 8b). Comme la portion sortante chez la souris adulte est formée de I_{to} , I_{Kur} , I_{ss} et pour savoir lequel de ces trois courants est responsable de cette diminution, on a testé l'effet du 4-hydroxytamoxifène sur chacun de ces courants séparément.

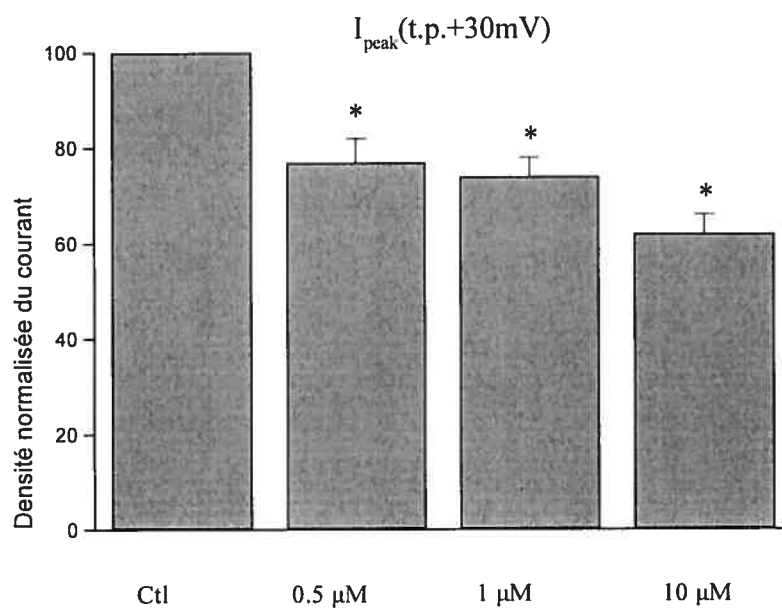
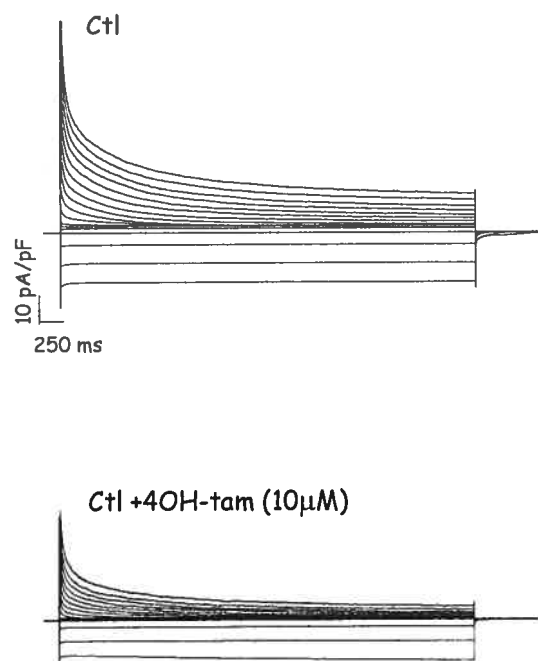


Figure 7. Effet concentration-dépendant du 0.5, 1 et 10 μM de 4-hydroxytamoxifène sur I_{peak} à +30 mV

a)



b)

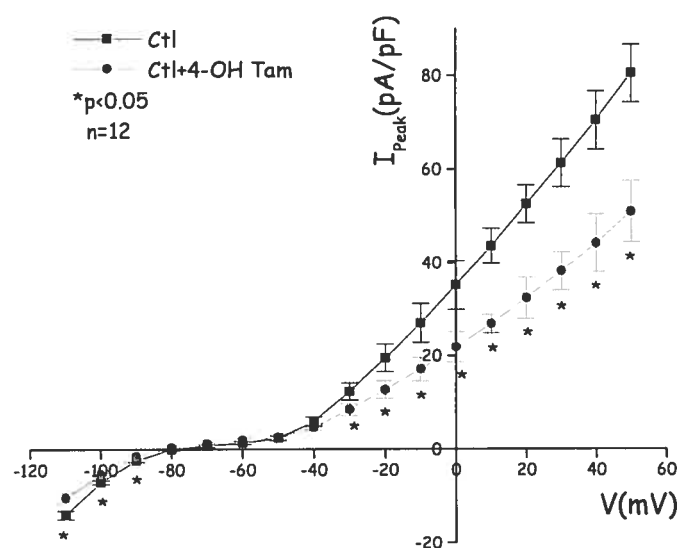


Figure 8a. Effet du 10 μ M de 4-hydroxytamoxifène sur I_{peak}

Figure 8b. Courbe courant-voltage de I_{peak} avant et après application de 10 μ M de 4-hydroxytamoxifène

3.1.2.2 Effet du 4-hydroxytamoxifène sur I_{to}

I_{to} a été isolé selon les techniques décrites dans la section précédente. L'analyse des enregistrements obtenus par patch-clamp a démontré que à +30 mV l'application aiguë de 4-hydroxytamoxifène (0.5, 1 et 10 μ M) sur les myocytes réduit significativement I_{to} et que cette réduction est concentration-dépendante (Figure 9).

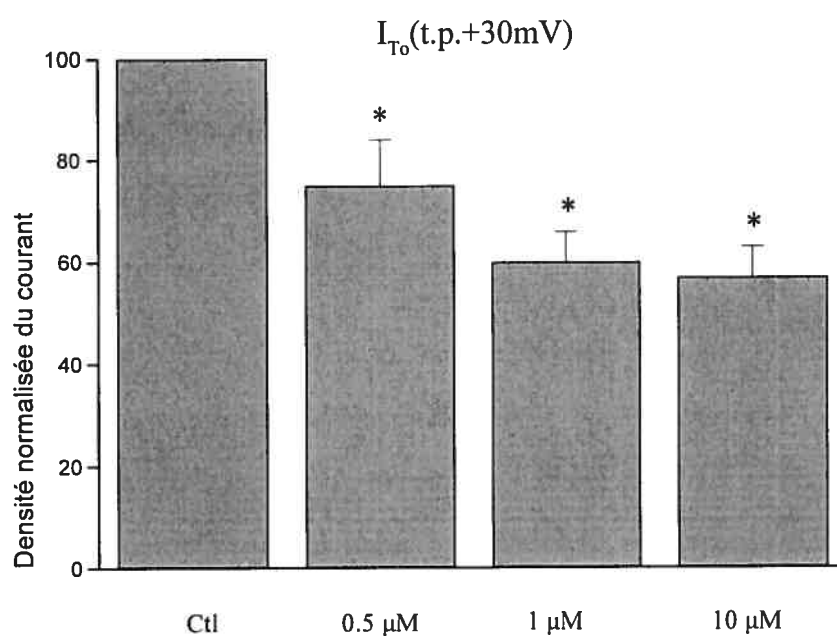


Figure 9. Effet concentration-dépendant du 0.5, 1 et 10 μ M de 4-hydroxytamoxifène sur I_{to} à +30 mV

À +30 mV, les concentrations 0.5 et 1 μ M diminuent respectivement I_{to} à 26.5 ± 4.3 pA/pF ($n=9$; $p<0.05$) et 21.28 ± 3.06 pA/pF ($n=10$; $p<0.05$) alors que les valeurs témoins avant traitement étaient de 34.95 ± 3.15 pA/pF et 35.4 ± 3.59 pA/pF respectivement. La figure 10a montre des tracés bruts de I_{to} enregistrés avant et après perfusion avec du 4-hydroxytamoxifène. Ces tracés indiquent une diminution de ce courant après application du médicament. La réduction la plus importante est observée après application de 10 μ M de 4-hydroxytamoxifène (Figure 10b) où on peut voir que I_{to} est diminué de 30.32 ± 3.42 pA/pF à 18.64 ± 2.29 pA/pF ($n=12$; $p<0.05$).

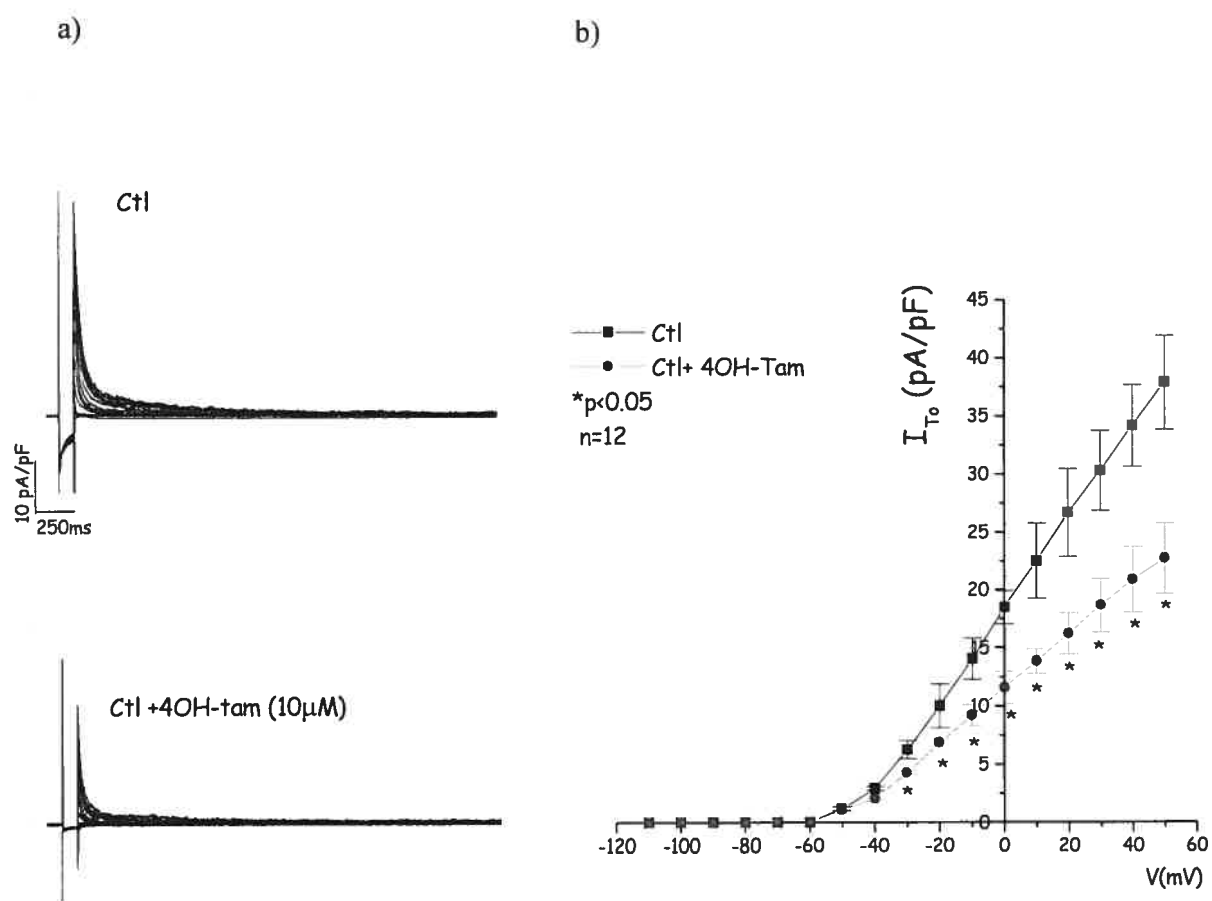


Figure 10a. Effet du 10 μ M de 4-hydroxytamoxifène sur I_{T_o}

Figure 10b. Courbe courant-voltage de I_{T_o} avant et après application de 10 μ M de 4-hydroxytamoxifène

3.1.2.3 Effet du 4-hydroxytamoxifène sur I_{Kur}

La perfusion des myocytes avec 0.5, 1 et 10 μM de 4-hydroxytamoxifène a aussi un effet réducteur et concentration-dépendant sur I_{Kur} . Ceci est encore illustré dans la figure 11 où on peut voir que à +30 mV les trois concentrations de 4-hydroxytamoxifène réduisent I_{Kur} . La figure 12 montre la courbe courant-voltage de I_{Kur} avant et après perfusion de 4-hydroxytamoxifène et on peut voir clairement que I_{Kur} est réduit après application du médicament. À partir d'une densité moyenne de I_{Kur} de 27.13 ± 2.34 pA/pF, 26.2 ± 3.2 pA/pF et 28 ± 3.55 pA/pF avant application du médicament, l'application aiguë des différentes concentrations du 4-hydroxytamoxifène diminue I_{Kur} , à +30 mV, à 21.42 ± 2.18 pA/pF ($n=9$; $p<0.05$), 18.87 ± 2.26 pA/pF ($n=10$; $p<0.05$) et 16.09 ± 2.62 pA/pF ($n=12$; $p<0.05$) pour 0.5, 1 et 10 μM respectivement.

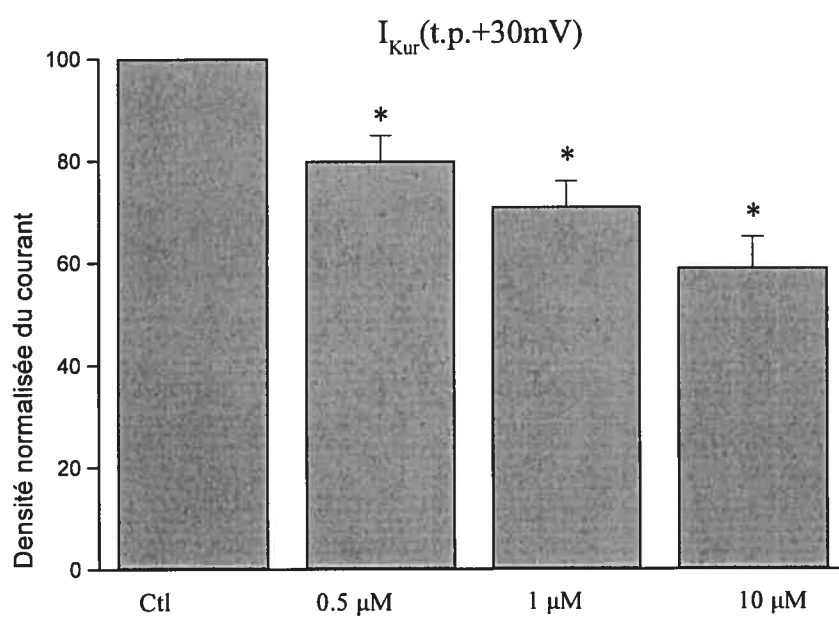


Figure 11. Effet concentration-dépendant du 0.5, 1 et 10 μ M de 4-hydroxytamoxifène sur I_{Kur} à +30 mV

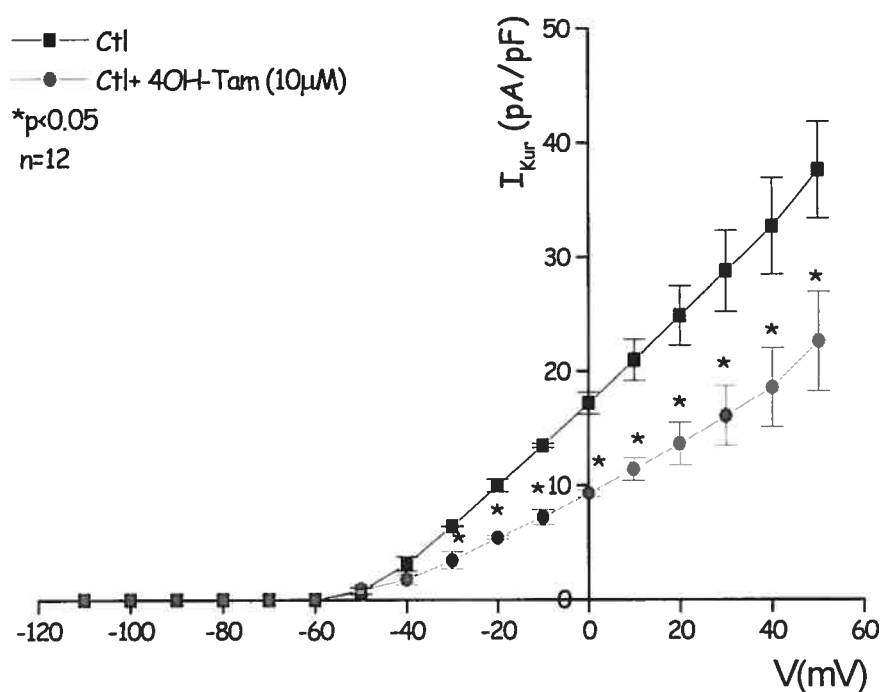


Figure 12. Courbe courant-voltage de I_{Kur} avant et après perfusion de 10 μ M de 4-hydroxytamoxifène

3.1.2.4 Effet du 4-hydroxytamoxifène sur I_{K1}

La figure 13 montre l'effet concentration-dépendant du 0.5, 1 et 10 μ M de 4-hydroxytamoxifène sur I_{K1} à -110 mV. I_{K1} était de -16.89 ± 1.66 pA/pF, -17.18 ± 1.41 pA/pF et -15.67 ± 1.13 pA/pF avant exposition au 0.5, 1 et 10 μ M de 4-hydroxytamoxifène à -110 mV respectivement. Les 3 concentrations du 4-hydroxytamoxifène atténuent I_{K1} à -15.05 ± 2.38 pA/pF ($n=9$; $p<0.05$), -13.54 ± 1.2 pA/pF ($n=10$; $p<0.05$) et -11.76 ± 1.46 pA/pF ($n=12$; $p<0.05$) respectivement. La

réduction de I_{K1} est illustrée dans la courbe courant-voltage de I_{K1} et I_{ss} avant et après perfusion avec 10 μM de 4-hydroxytamoxifène (figure 14).

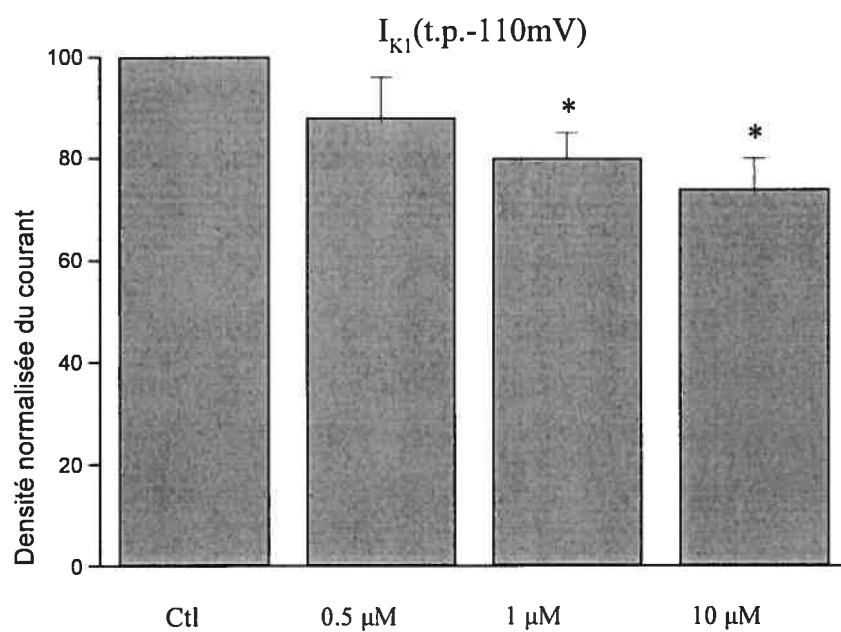


Figure 13. Effet concentration-dépendant du 0.5, 1 et 10 μM de 4-hydroxytamoxifène sur I_{K1} à -110 mV

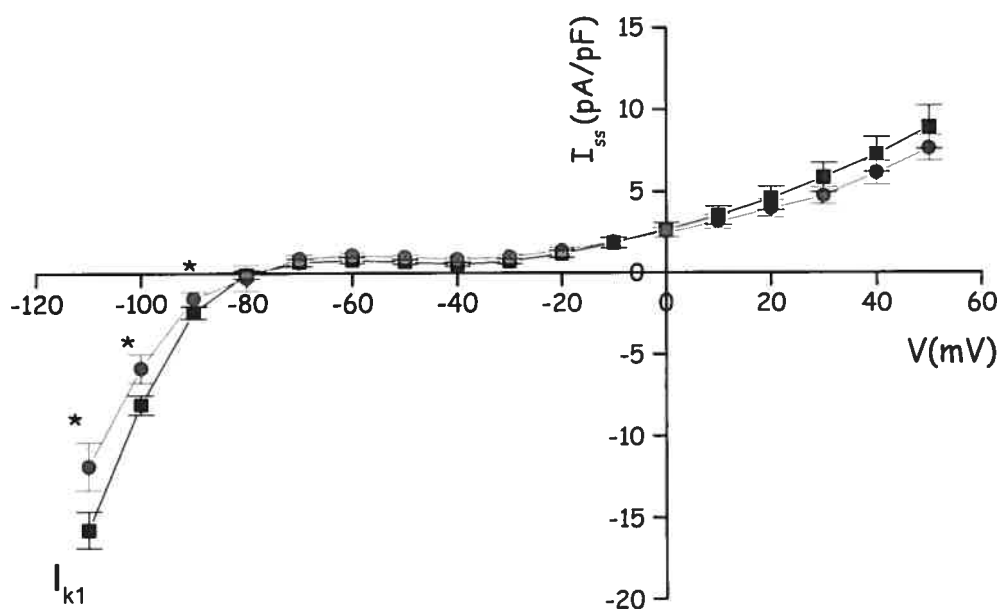


Figure 14. Courbe courant-voltage de I_{K1} et I_{ss} avant et après perfusion avec 10 μ M de 4-hydroxytamoxifène

3.1.2.5 Effet du 4-hydroxytamoxifène sur I_{ss}

Au contraire des autres courants, I_{ss} n'est pas affecté par le 4-hydroxytamoxifène. Les courbes courant-voltage de I_{ss} obtenues avant et après exposition au médicament sont confondues (figure 14). Et alors, une exposition aiguë au 4-hydroxytamoxifène n'a pas d'effet sur I_{ss} . Ceci est encore illustré dans la figure 15 où on peut voir que les trois concentrations de 4-hydroxytamoxifène n'ont pas d'effet sur I_{ss} .

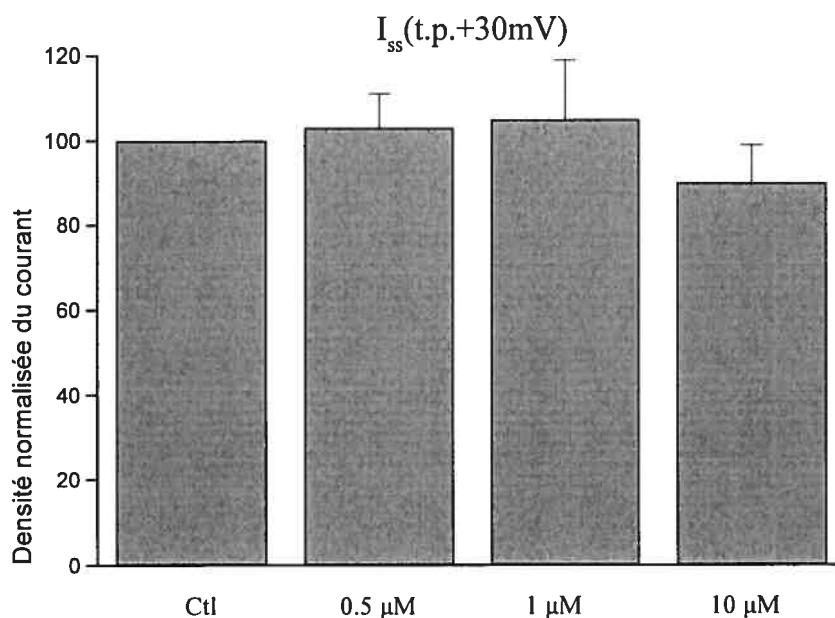


Figure 15. Effet concentration-dépendant du 0.5, 1 et 10 μ M de 4-hydroxytamoxifène sur I_{ss} à +30 mV

3.1.2.6 Effet du ICI 182,780 et de l'actinomycine D sur les courants potassiques

L'ICI 182, 780 (antagoniste spécifique des récepteurs oestrogéniques) et l'actinomycine D (inhibiteur de la synthèse protéique) ont aussi été utilisés pour voir si l'effet du 4-hydroxytamoxifène sur les courants K^+ est médié par les RE ou par la synthèse protéique. Il a été démontré que la concentration choisie (10 μ M) du ICI 182, 780 et de l'actinomycine D inhibent respectivement l'effet des oestrogènes sur les RE et la synthèse protéique.

Les courants K^+ sont enregistrés après perfusion des myocytes avec du Tyrode, puis 10 minutes après perfusion avec 10 μ M de ICI 182,780 ou avec de l'actinomycine D, et

enfin après 10 minutes d'application de 10 μ M 4-hydroxytamoxifène. L'analyse de ces enregistrements a démontré que les courants potassiques ne sont pas altérés et qu'il n'y a aucun changement significatif de la densité des courants après perfusion avec les drogues. Ce qui laisse dire que l'action aiguë du tamoxifène est médiée par les récepteurs oestrogéniques et que cette diminution de courant est due à un effet direct du tamoxifène sur les courants potassiques.

3.1.2.7 Cinétique

La comparaison de l'inactivation à l'équilibre de I_{Kur} et de I_{to} avant et après application aiguë du 4-hydroxytamoxifène a permis de démontrer qu'il n'y a pas eu de changement dans la proportion de canaux inactivés suite à l'application du médicament. Il en est de même pour le recouvrement de l'inactivation de I_{Kur} et de I_{to} où on a pu démontrer que le temps requis pour le canal d'être fonctionnel est le même avant et après perfusion du 4-hydroxytamoxifène. Ainsi, le 4-hydroxytamoxifène n'affecte pas la cinétique de I_{Kur} et de I_{to} .

3.2 *ÉTUDE CHRONIQUE*

Afin de déterminer si une exposition chronique au tamoxifène affecte les courants K^+ , des souris femelles ont été utilisées. Ces souris ont été divisées en deux groupes. L'un est traité avec du placebo (CTL) et l'autre avec des implants du tamoxifène (CTL+ TAM) (5 mg sur 60 jours) . À la fin du traitement, les courants K^+ ainsi que les potentiels d'action ont été mesurés.

3.2.1 *Effet du tamoxifène sur le potentiel d'action chez la souris*

L'analyse des potentiels d'action enregistrés dans les 2 groupes CTL et CTL+TAM a permis de démontrer que la durée du potentiel d'action mesurée à 90% de repolarisation (APD_{90}) a diminué de 24.35 ± 0.59 ms ($n=10$) dans le groupe témoin non traité à 11.95 ± 1.03 ms ($n=11$; $p<0.05$) dans le groupe traité par le tamoxifène (Figure 16). De plus, le potentiel membranaire de repos était significativement plus négatif dans le groupe traité (-77.91 mV ± 1.21 ; $n=12$; $p<0.05$) comparativement au groupe non traité (-71.9 mV ± 0.85 ; $n=11$).

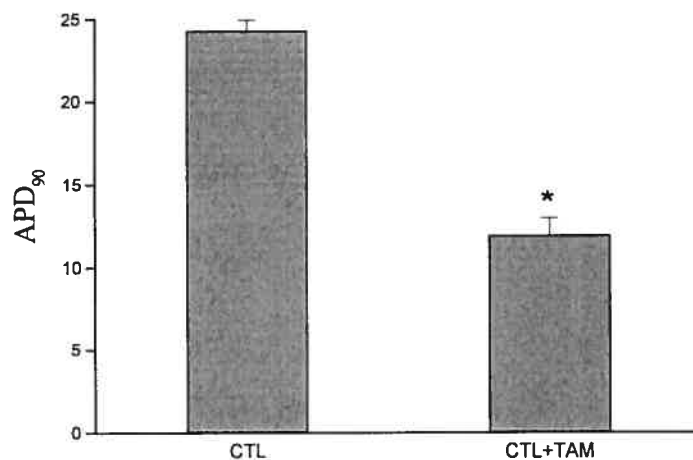


Figure 16. Diminution de la durée du potentiel d'action dans le groupe traité par le tamoxifène comparé au groupe témoin.

3.2.2 Effet du tamoxifène sur les courants potassiques chez la souris

3.2.2.1 Effet du tamoxifène sur I_{to}

Au contraire de ce qui a été obtenu dans l'étude aiguë, un traitement à long terme avec le tamoxifène augmente significativement la densité de I_{to} . Ceci est illustré dans la figure 17a où on peut voir que I_{to} est significativement augmenté dans le groupe traité (n=12) avec le tamoxifène versus groupe non traité (n=12). De même, dans la courbe moyenne courant-voltage, on peut voir que la densité de I_{to} est plus grande dans le groupe traité avec le tamoxifène comparé au groupe témoin (figure 17b). Par exemple à + 30 mV, I_{to} passe de 30.85 ± 2.21 pA/pF (n=11) à 51.31 ± 1.91 pA/pF (n=12; $p < 0.05$) dans le groupe traité.

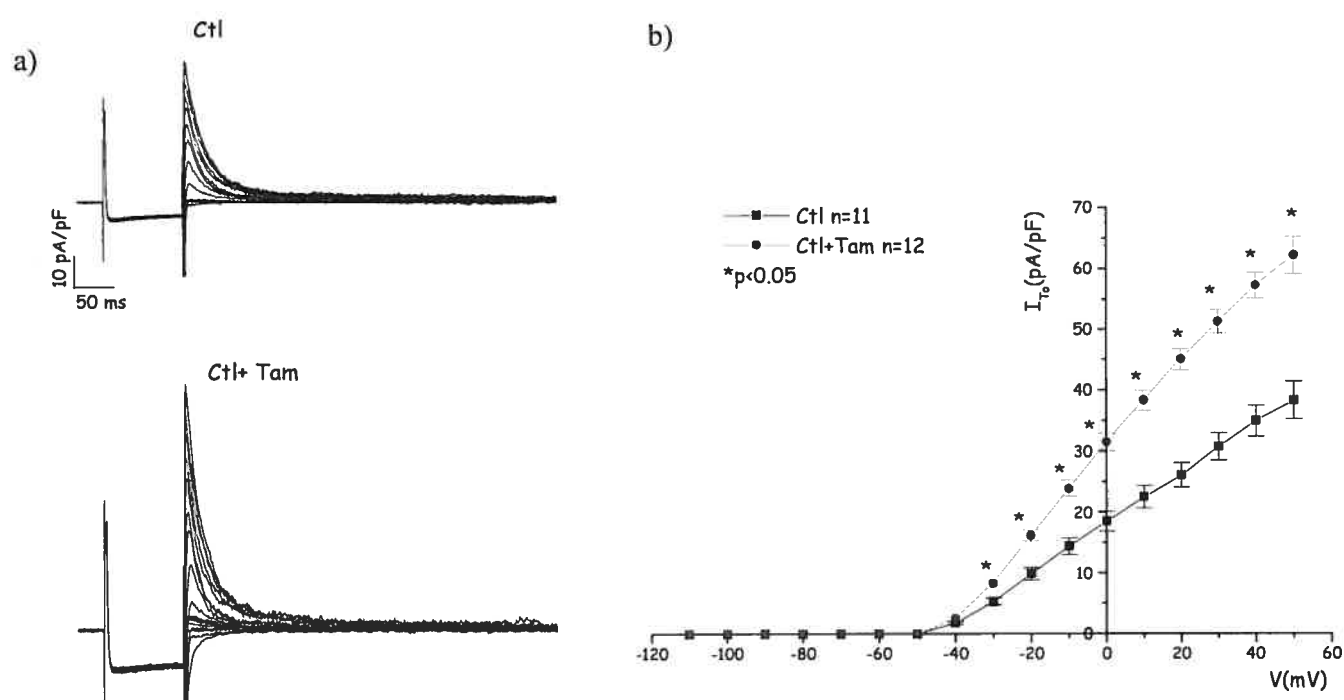


Figure 17a. Effet chronique du tamoxifène sur I_{to}

Figure 17b. Courbe courant-voltage de I_{to} sans et avec traitement par le tamoxifène

3.2.2.2 Effet du tamoxifène sur I_{Kur}

L'analyse des enregistrements obtenus par patch-clamp a démontré qu'un traitement chronique au tamoxifène augmente significativement I_{Kur} comparé au groupe témoin (figure 18a). De même, dans la courbe moyenne courant-voltage on peut voir que la densité de I_{Kur} est plus grande dans le groupe traité avec le tamoxifène comparé au groupe témoin. À +30 mV, I_{Kur} augmente de 25.02 ± 2.64 pA/pF (n=10) à 39.85 ± 3.33 pA/pF (n=10; $p<0.05$) (figure 18b).

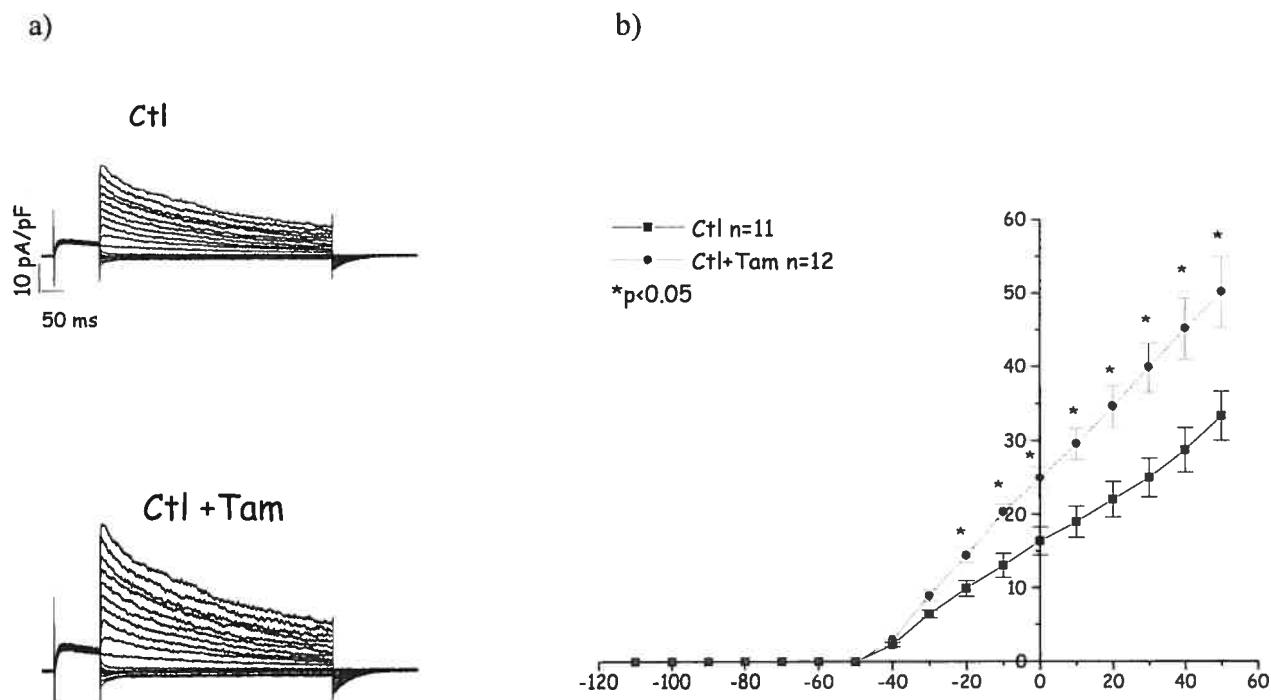


Figure 18a. I_{Kur} avant et après traitement chronique par le tamoxifène

Figure 18b. Courbe courant-voltage de I_{Kur} sans et avec traitement par le tamoxifène

3.2.2.3 Effet du tamoxifène sur I_{K1} et I_{ss}

Le traitement avec le tamoxifène augmente aussi I_{K1} . La densité moyenne de I_{K1} dans le groupe témoin étant de -18.33 ± 2.34 pA/pF à -110 mV ($n=11$), elle est de -28.17 ± 2.36 pA/pF ($n=12$; $p<0.05$) dans le groupe traité au tamoxifène. I_{ss} qui n'est pas du tout affecté après un traitement aigu par le 4-hydroxytamoxifène, est augmenté après un traitement chronique au tamoxifène. Par exemple à $+30$ mV, I_{ss} a augmenté de 30.85 ± 2.21 pA/pF ($n=10$) dans le groupe témoin à 51.31 ± 1.91 pA/pF dans le groupe traité ($n=10$; $p<0.05$).

4 DISCUSSION

4.1 Importance du « modèle souris » pour l'étude du système cardiaque

Depuis longtemps, les modèles animaux ont été utilisés afin de tester les différentes hypothèses visant à élucider des phénomènes physiologiques et pathologiques. Par leur proximité métabolique et physiologique avec l'homme, leur reproduction et leur facilité de manipulation et d'élevage, les souris sont depuis longtemps objet de manipulations pour les scientifiques. De plus, vu que la souris a une petite taille, il est possible d'enregistrer des données d'électrophysiologie, de pression sanguine et d'électrocardiogramme et un grand nombre d'animaux peuvent être utilisés à la fois accélérant ainsi l'obtention et l'analyse des données.

De plus, la possibilité d'établir des souches génétiquement modifiées permet néanmoins de créer des lignées hypersensibles à des maladies affectant l'homme. En quelques décennies, la souris transgénique est devenue la meilleure alliée du chercheur. Elle est considérée comme un outil de référence dans l'étude des maladies humaines, la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les phénomènes physiologiques et pathologiques ainsi que dans la découverte de moyens diagnostiques et de nouveaux traitements. En effet, l'annonce, en décembre 2005, du décryptage à 95% du génome de la souris par un consortium international de chercheurs apparaît comme un événement sans précédent pour la communauté scientifique, «comparable au séquençage du génome humain», selon le Pr. Pierre Chambon, de

l'Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire (IGBMC), à Strasbourg (Tiré de <http://terresacree.org/souris.htm>).

La souris est un modèle intéressant pour l'étude de l'électrophysiologie cardiaque puisque comme chez l'humain, le ventricule de la souris possède I_{to} et I_{K1} par contre I_{Kur} présent au niveau du ventricule de la souris n'est pas présent au niveau ventriculaire de l'homme. Cependant, notons que I_{Kur} est un courant très important au niveau des oreillettes humaines. Donc la présence de I_{Kur} chez la souris peut servir de modèle intéressant pour caractériser ce courant.

Jusqu'à maintenant, il n'y a pas un modèle parfait. Tous les modèles animaux utilisés, aussi bons soient ils, ont des limites. Pour le lapin, la durée du potentiel d'action ainsi que la base moléculaire de I_{Kr} et I_{K1} sont similaires à l'humain alors que la limitation majeure de ce modèle réside dans le fait que chez le lapin femelle, qui ne possède pas un cycle oestrus, les niveaux d'œstrogènes sont continuellement bas. Dans cette situation, l'utilisation de ce modèle animal rend toute extrapolation de ces résultats à l'humain très difficile. Le cobaye partage le plus de courant K^+ avec l'humain (I_{Kr} , I_{Ks} et I_{K1}). L'élément manquant, I_{to} , est présent chez le lapin, le rat et la souris alors que sa base moléculaire (Kv4.3) n'est présente que chez le rat, la souris et le chien.

D'autre part, l'enregistrement ainsi que l'étude de la densité et de la cinétique des courants K^+ présents chez la souris sont rendues possibles grâce à une méthode développée dans notre laboratoire. Cette méthode permet d'élucider les mécanismes responsables des différences reliées au sexe et soulève l'importance du choix du modèle expérimental. Le dévoilement d'une régulation de l'électrophysiologie cardiaque par les

hormones sexuelles mâles ouvre la porte à l'étude des effets des hormones sexuelles féminines. La surexpression du récepteur ER α chez des souris ovariectomisées ainsi que le changement au niveau de I_{to} relié à la présence et à l'absence d'œstrogènes prouvent que les myocytes ventriculaires répondent aux changements de concentration d'hormones sexuelles féminines (Eghbali et coll., 2005).

En plus des caractéristiques mentionnées ci-haut, l'accès aux souris transgéniques déficientes en récepteurs aux oestrogènes (ERKO, «estrogen receptor knock-out mice») nous a motivé à choisir la souris comme modèle animal dans nos études pour éclaircir le rôle exact des oestrogènes au niveau cardiaque.

4.2 *Résumé des études présentées dans ce mémoire*

Depuis plus de vingt ans, le tamoxifène est le médicament le plus utilisé dans la prévention et le traitement du cancer du sein. Cependant, certaines observations suggèrent que le tamoxifène peut prolonger l'intervalle QT sur l'ECG de surface et donc prolonger la repolarisation cardiaque. Les arythmies ventriculaires et plus particulièrement les torsades de pointes peuvent survenir surtout dans les cas de surdosage ou d'interactions pharmacocinétiques. Le fait qu'un certain nombre de médicaments qui inhibent les courants K^+ cardiaques et qui prolongent la durée du potentiel d'action peuvent causer le syndrome du long QT et induire des arythmies, associé au fait que le tamoxifène peut inhiber des courants calciques et sodiques nous ont motivé à examiner l'effet de ce SERM sur les courants K^+ cardiaques. Le rôle connu des courants K^+ dans la phase de repolarisation du potentiel d'action est consistant avec les

mécanismes qui sont potentiellement impliqués dans les formes acquises de syndrome du long QT (une prolongation de la repolarisation peut conduire à des dépolarisations précoces et induire des arythmies).

Dans cette étude, on a utilisé la technique de patch-clamp en mode « whole-cell » pour étudier les effets aigus et chroniques du tamoxifène sur les courants K^+ présents au niveau des myocytes ventriculaires de souris.

Dans l'étude aiguë, les mesures électrophysiologiques ont été obtenues en conditions témoins et avec la présence du 4-hydroxytamoxifène appliqué à différentes concentrations (0.5, 1 et 10 μM). Les résultats de ces études montrent que I_{to} est significativement diminué de 25%, 40% et 43% alors que I_{Kur} est diminué de 20%, 29% et 41% par 0.5, 1 et 10 μM 4-hydroxytamoxifène respectivement. 1 et 10 μM diminue significativement I_{K1} de 20% et de 26% tandis que I_{ss} n'est pas affecté. La réduction de la densité de ces courants peut expliquer en partie les troubles du rythme observés dans d'autres études ainsi que la prolongation de l'intervalle QT et le retard de repolarisation décrits chez les patients traités pendant une courte période de temps par le tamoxifène. À la concentration de 10 μM , aucun effet significatif n'est observé sur l'inactivation à l'équilibre et le recouvrement de l'inactivation de I_{to} et de I_{Kur} . De plus, notre incapacité à stimuler des potentiels d'action peut être due au fait que le tamoxifène inhibe les courants sodiques (I_{Na}). Finalement, afin d'éliminer ou de confirmer l'implication du récepteur oestrogénique, nous avons utilisé également l'actinomycine D et le ICI 182, 780.

Dans l'étude chronique, l'analyse des enregistrements obtenus par patch-clamp a démontré que contrairement à qui a été obtenu lors d'un traitement aigu, un traitement à

long terme au tamoxifène augmente significativement les courants potassiques sortants (I_{to} , I_{Kur} et I_{ss}) et le courant potassique entrant I_{K1} . De plus, ces souris présentent un intervalle QTc et une durée de potentiel d'action inférieurs que ceux du groupe témoin résultant d'une augmentation des courants K^+ .

4.3 *Mécanismes pouvant expliquer les effets opposés du tamoxifène*

Une étude précédente faite dans notre laboratoire a démontré qu'il existe une différence mâle/femelle au niveau transcriptionnel (ARNm) dans l'expression du canal K^+ Kv1.5 responsable de I_{Kur} (Trépanier-Boulay et coll., 2001). Le cœur est une cible non seulement pour les oestrogènes mais également pour les actions des androgènes car les deux types de récepteurs y sont présents. Normalement, les gènes de Kv 1.5 sont stimulés par le récepteur aux androgènes et le niveau de transcription est augmenté. Il est possible que les androgènes puissent augmenter l'expression du canal K^+ chez les souris mâles. Par contre, les oestrogènes diminuent le signal de transduction au niveau transcriptionnel ainsi que le niveau d'expression de certains canaux K^+ . Ces études suggèrent que les oestrogènes produisent un effet répresseur sur les courants K^+ cardiaques. Toutefois, peu de données sont disponibles concernant les effets des oestrogènes au niveau cardiaque et des études supplémentaires sont requises. On considère généralement que les effets des oestrogènes sur l'excitabilité cellulaire sont médiés par la régulation de l'expression des canaux ioniques résultant de la liaison de l'hormone à un récepteur intracellulaire. Cependant certains effets des oestrogènes peuvent être également produits par une action directe sur les canaux ioniques. La voie classique de l'action des oestrogènes se fait dans le noyau où le récepteur œstrogénique se lie aux éléments de réponse aux œstrogènes

(ERE) pour activer la transcription des gènes cibles (Beato & Klug, 2000). Cette voie requiert un certain temps pour avoir une activation complète, typiquement plus d'une heure. Par contre, il a été rapporté que les agonistes ou antagonistes oestrogéniques peuvent avoir des actions rapides comme dans le cas de cette étude (Falkenstein et coll., 2000; Nadal et coll., 2001; Levin, 2002). Le ou les mécanismes de ces actions non-génomiques des oestrogènes demeurent une source de controverse concernant l'existence et l'identité des récepteurs qui médient ces réponses. Beaucoup d'hypothèses ont été proposées, incluant la présence au niveau de la membrane plasmique des récepteurs oestrogéniques classiques $ER\alpha$ et $ER\beta$, des récepteurs aux stéroïdes, des protéines sensibles aux oestrogènes notamment la sous-unité β du courant potassique maxi-K ou des récepteurs adrénergiques (Nadal et coll., 2000). Certaines études sont consistantes avec ces hypothèses en décrivant la présence des récepteurs oestrogéniques au niveau de la membrane plasmique (Lizotte et coll., abstract 2006; Collins & Webb, 1999; Li et coll., 2003; Razandi et coll., 2004; Song et coll., 2004) et en plus la détection des $ER\alpha$ et $ER\beta$ au niveau des mitochondries (Chen et coll., 2004; Yang et coll., 2004), suggérant que les oestrogènes peuvent affecter directement la fonction mitochondriale via une voie non-nucléaire.

Suite à la diminution des courants K^+ obtenue dans l'étude à court terme, et à la rapidité des effets du tamoxifène (inférieur à 30 minutes), nous avons pensé que le tamoxifène pouvait agir directement sur le canal K^+ ou via un récepteur aux oestrogènes membranaires sans passer par le récepteur membranaire classique. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons perfusé les myocytes avec l'actinomycine D et le ICI 182,780 et suivi d'une perfusion avec du 4-hydroxytamoxifène. Cependant cette perfusion des

myocytes n'a eu aucun effet majeur sur l'amplitude des courants K^+ . Cette étude montre qu'une exposition aiguë au 4-hydroxytamoxifène produit une inhibition directe de certains courants potassiques à des concentrations thérapeutiques affectant ainsi la repolarisation.

Concernant l'étude chronique, comme mentionné ci-haut, les oestrogènes inhibent les courants K^+ . Ainsi, lors d'un traitement à long terme, il est fort probable que le tamoxifène par son effet antagoniste des récepteurs aux oestrogènes puisse annuler l'effet inhibiteur des oestrogènes sur les courants K^+ . Ceci expliquerait l'augmentation des courants K^+ observée dans cette étude ainsi que l'absence d'une prolongation de l'intervalle QT et donc des torsades de pointes lors d'un traitement chronique avec le tamoxifène. Ainsi, les données obtenues dans cette étude appuient l'hypothèse qu'un traitement à long terme avec le tamoxifène, développe un phénomène compensatoire qui protège les femmes prenant ce médicament contre les arythmies et les risques de torsades de pointes.

4.4 Directions futures

Les résultats obtenus dans cette étude ont permis une meilleure compréhension des mécanismes d'action du tamoxifène dans l'électrophysiologie cardiaque. Suite aux résultats de ce projet, il semble donc primordial d'explorer plus en détail le rôle des oestrogènes et des antagonistes oestrogéniques au niveau de l'expression génique des canaux K^+ et fournir des explications plus approfondies des effets du tamoxifène sur la

repolarisation cardiaque. Des études sur la caractérisation des effets du tamoxifène et des oestrogènes sur l'électrophysiologie cardiaque fournira de nouvelles connaissances sur la compréhension des mécanismes d'action des antagonistes oestrogéniques et des hormones sexuelles au niveau du système cardiovasculaire.

En effet, grâce à l'approche transgénique, on a pu établir des souris génétiquement modifiées. Ainsi, il a été possible d'avoir accès à des souris transgéniques dont le gène fonctionnel du récepteur aux oestrogènes α (ERKO α) ou β (ERKO β) ont été inactivés. Ce modèle est caractérisé par un niveau élevé d'oestrogènes dû à l'absence d'une rétroaction négative exercée généralement par les récepteurs oestrogéniques. Vu les importantes informations que peuvent nous fournir ce modèle sur le rôle des oestrogènes dans la régulation des courants K^+ ainsi que dans la repolarisation cardiaque, une étudiante de notre laboratoire est en train d'étudier ce modèle de souris.

Puisque le tamoxifène est utilisé dans la plupart du temps pour traiter le cancer du sein à long terme chez des femmes ménopausées ou chez des femmes avec ovariectomie, les souris ovariectomisées sont utilisées pour reproduire ce même profil hormonal. Ces souris vont être traitées à long terme avec des implants sous-cutanés du tamoxifène. Ce nouveau projet nous aidera à élucider l'effet du tamoxifène en cas d'absence de la source principale des oestrogènes et des récepteurs oestrogéniques sur les courants K^+ et alors sur la repolarisation cardiaque. De plus, dans ce modèle, nous allons pouvoir caractériser et mettre en évidence l'effet des oestrogènes produits par les sources secondaires tels que le foie, la surrénale, les seins et le tissu adipeux. Ces sources secondaires d'oestrogènes sont

particulièrement importantes chez les femmes lors de la post-ménopause (Fang H. et coll., 2001).

Une fois les études électrophysiologiques complétées sur nos différents modèles de souris (souris intactes, souris traitées avec des implants de tamoxifène, souris ovariectomisées et souris ovariectomisées traitées avec des implants de tamoxifène), nous allons avoir des données importantes sur l'amplitude et la densité des courants K^+ . En fait, les études effectuées dans ce projet sur des souris témoins et des souris traitées montrant une augmentation de l'amplitude des courants K^+ suggèrent la présence d'une différence au niveau de l'expression des canaux K^+ . Et alors, une analyse protéique du tissu ventriculaire pourrait répondre à cette hypothèse et donc déterminer à quel niveau il y a une diminution ou une augmentation d'amplitude ou d'expression des courants ou canaux K^+ . Il serait aussi intéressant d'étudier parallèlement les niveaux d'ARNm des diverses sous-unités responsables des courants K^+ .

D'autre part, bien que la souris soit un bon modèle pour étudier l'effet du tamoxifène sur l'électrophysiologie cardiaque, il est très important de compléter et poursuivre nos études en utilisant le cobaye, qui possède I_{Kr} et I_{Ks} , deux courants importants dans la repolarisation chez l'homme. Les expériences de Western blot sur des protéines de cobayes traités à long terme avec des implants de tamoxifène pourraient nous fournir des informations essentielles sur l'effet de ce médicament sur l'expression protéique des canaux correspondants de ces deux courants.

Bien qu'il a été rapporté que l'utilisation du tamoxifène inhibe certains types de courants ioniques, notamment potassiques chez les modèles animaux, il n'y a pas d'évidence clinique démontrant une association entre le tamoxifène et les arythmies. D'autre part, puisque le tamoxifène est un médicament utilisé pour le traitement et la prévention du cancer du sein chez les femmes, il serait très intéressant de faire des études directes chez l'humain et de voir si le QT chez les femmes traitées avec du tamoxifène est augmenté par rapport aux femmes témoins. Le design de l'étude devrait être rigoureux pour toute étude clinique. Par exemple l'âge, les niveaux d'hormones, l'association médicamenteuse, les maladies cardiaques, l'obésité et beaucoup d'autres critères et conditions doivent être respectées afin de constituer un bon modèle clinique pour poursuivre ces recherches.

5 CONCLUSION

Les résultats fort encourageants présentés dans ce mémoire exposent les mécanismes d'action du tamoxifène après un traitement à court et à long terme et guident les futures recherches sur ce sujet. Étant donné la nouveauté et l'importance des données de ce projet, il apparaît donc essentiel d'élucider et d'approfondir les effets reliés à la prise du tamoxifène sur la repolarisation au niveau de l'activité électrique cardiaque. Les résultats de nos recherches nous montrent clairement qu'il existe des différences importantes entre l'effet aigu et chronique du tamoxifène sur la repolarisation cardiaque chez la souris.

Ce projet montre qu'un traitement aigu au tamoxifène produit une diminution des courants K^+ alors qu'un traitement à long terme au tamoxifène produit une augmentation des courants K^+ pouvant expliquer l'absence des arythmies et des troubles cardiaques chez les femmes prenant du tamoxifène en traitement chronique pour le traitement du cancer du sein. De plus, les données présentées dans ce mémoire de maîtrise permettent de valider la souris comme modèle expérimental pour l'étude des mécanismes fondamentaux reliés au tamoxifène.

Ce mémoire a permis des avancements majeurs dans l'explication des effets du tamoxifène sur l'électrophysiologie cardiaque. Entre autres, les mécanismes d'action du tamoxifène sur les courants ioniques responsables de la repolarisation cardiaque à court et à long terme d'exposition ont été documentés. L'avancement du savoir dans ces domaines permet l'utilisation sécuritaire du tamoxifène chez les femmes.

RÉFÉRENCES

1. Osborne CK, Zhao H, & Fuqua SA (2000). Selective estrogen receptor modulators: structure, function, and clinical use. *J Clin Oncol.* **18**(17):3172-86.
2. Mouridsen H, Gershanovich M, Sun Y, Perez-Carrion R, Boni C, Monnier A, Apffelstaedt J, Smith R, Sleeboom HP, Jaenicke F, Pluzanska A, Dank M, Becquart D, Bapsy PP, Salminen E, Snyder R, Chaudri-Ross H, Lang R, Wyld P, & Bhatnagar A (2003). Phase III study of letrozole versus tamoxifen as first-line therapy of advanced breast cancer in postmenopausal women: analysis of survival and update of efficacy from the International Letrozole Breast Cancer Group. *J Clin Oncol.* **1**;21(11):2101-9.
3. Cuzick J, Forbes J, Edwards R, Baum M, Cawthorn S, Coates A, Hamed A, Howell A, Powles T, & IBIS investigators (2002). First results from the International Breast Cancer Intervention Study (IBIS-I): a randomised prevention trial. *Lancet.* **14**;360(9336):817-24.
4. Park WC, & Jordan VC (2002). Selective estrogen receptor modulators (SERMS) and their roles in breast cancer prevention. *Trends Mol Med.* **8**(2):82-8.

5. Newcomb PA, Storer BE, Longnecker MP, Mittendorf R, Greenberg ER, Clapp RW, Burke KP, Willett WC, & MacMahon B (1994). Lactation and a reduced risk of premenopausal breast cancer. *N Engl J Med.* **13**;330(2):81-7.
6. Powles TJ. The case for clinical trials of tamoxifen for prevention of breast cancer (1992). *Lancet.* **7**;340(8828):1145-7
7. Jaiyesimi IA, Buzdar AU, Decker DA, & Hortobagyi GN (1995). Use of tamoxifen for breast cancer: twenty-eight years later. *J Clin Oncol.* **13**(2):513-29.
8. Fisher B, Dignam J, Bryant J, DeCillis A, Wickerham DL, Wolmark N, Costantino J, Redmond C, Fisher ER, Bowman DM, Deschenes L, Dimitrov NV, Margolese RG, Robidoux A, Shibata H, Terz J, Paterson AH, Feldman MI, Farrar W, Evans J, & Lickley HL (1996). Five versus more than five years of tamoxifen therapy for breast cancer patients with negative lymph nodes and estrogen receptor-positive tumors. *J Natl Cancer Inst.* **6**;88(21):1529-42
9. Fisher BJ, Perera FE, Cooke AL, Opeitum A, & Stitt L (1998). Long-term follow-up of axillary node-positive breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen alone: patterns of recurrence. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **1**;42(1):117-23

10. Shin SC, Choi JS, & Li X (2006). Enhanced bioavailability of tamoxifen after oral administration of tamoxifen with quercetin in rats. *Int J Pharm.* **26**;313(1-2):144-9.
11. Bernstein L, Deapen D, Cerhan JR, Schwartz SM, Liff J, McGann-Maloney E, Perlman JA, & Ford L. (1999) Tamoxifen therapy for breast cancer and endometrial cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* **6**;91(19):1654-62
12. Clarke SC, Schofield PM, Grace AA, Metcalfe JC, & Kirschenlohr HL. (2001) Tamoxifen effects on endothelial function and cardiovascular risk factors in men with advanced atherosclerosis. *Circulation.* **20**;103(11):1497-502
13. Grey AB, Stapleton JP, Evans MC, Tatnell MA, Ames RW, & Reid IR (1995). The effect of the antiestrogen tamoxifen on bone mineral density in normal late postmenopausal women. *Am J Med.* **99**(6):636-41
14. Powles TJ, Hickish T, Kanis JA, Tidy A, & Ashley S. (1996). Effect of tamoxifen on bone mineral density measured by dual-energy x-ray absorptiometry in healthy premenopausal and postmenopausal women. *J Clin Oncol.* **14**(1):78-84
15. Osborne CK. (1998). Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med.* **26**;339(22):1609-18.

16. Williams GM, & Hard GC. (1994). Correspondence re: R. R. Love, The National Surgical Adjuvant Breast Project (NSABP) Breast Cancer Prevention Trial revisited. *Cancer Epidemiol., Biomarkers & Prev.*, 2: 403-407, 1993. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 3(2):185-6
17. Williams JK, Wagner JD, Li Z, Golden DL, & Adams MR.(1997). Tamoxifen inhibits arterial accumulation of LDL degradation products and progression of coronary artery atherosclerosis in monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17(2):403-8.
18. Sunderland MC, & Osborne CK. (1991). Tamoxifen in premenopausal patients with metastatic breast cancer: a review. *J Clin Oncol.* 9(7):1283-97
19. Langan S, Jordan VC, Koch R, & McCague R.(1988). Ligand interaction at the estrogen receptor to program antiestrogen action: a study with nonsteroidal compounds in vitro. *Endocrinology.* 122(4):1449-54.
20. Lien EA, Solheim E, Lea OA, Lundgren S, Kvinnsland S, & Ueland PM. (1989). Distribution of 4-hydroxy-N-desmethyltamoxifen and other tamoxifen metabolites in human biological fluids during tamoxifen treatment. *Cancer Res.* 49(8):2175-83

21. Lonning PE, Hall K, Aakvaag A, & Lien EA. (1992). Influence of tamoxifen on plasma levels of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding protein I in breast cancer patients. *Cancer Res.* **1**;52(17):4719-23
22. Poon GK, Chui YC, McCague R, Llinning PE, Feng R, Rowlands MG, & Jarman M. (1993). Analysis of phase I and phase II metabolites of tamoxifen in breast cancer patients. *Drug Metab Dispos.* **21**(6):1119-24
23. Buckley MM, Goa KL. (1989). Remission induction in children with acute non-lymphocytic leukemia using cytosine arabinoside and doxorubicin or daunorubicin: a report from the Childrens Cancer Study Group. *Drugs.* **37**(4):451-90
24. Lien EA, Wester K, Lonning PE, Solheim E, & Ueland PM. (1991). Distribution of tamoxifen and metabolites into brain tissue and brain metastases in breast cancer patients. *Br J Cancer.* **63**(4):641-5
25. Jordan VC. (1995) .Third annual William L. McGuire Memorial Lecture. "Studies on the estrogen receptor in breast cancer"--20 years as a target for the treatment and prevention of cancer. *Breast Cancer Res Treat.* **36**(3):267-85
26. Mani C, Gelboin HV, Park SS, Pearce R, Parkinson A, & Kupfer D. (1993). Metabolism of the antimammary cancer antiestrogenic agent tamoxifen. I.

- Cytochrome P-450-catalyzed N-demethylation and 4-hydroxylation. *Drug Metab Dispos.* **21**(4):645-56.
27. Crewe HK, Ellis SW, Lennard MS, & Tucker GT. (1997). Variable contribution of cytochromes P450 2D6, 2C9 and 3A4 to the 4-hydroxylation of tamoxifen by human liver microsomes. *Biochem Pharmacol.* **24**;53(2):171-8.
28. Coezy V, Borgna JL, & Rochefort H. (1982). Tamoxifen and metabolites in MCF7 cells: correlation between binding to estrogen receptor and inhibition of cell growth. *Cancer Res.* **42**(1):317-23.
29. Katzenellenbogen BS, Norman MJ, Eckert RL, Peltz SW, & Mangel WF. (1984). Bioactivities, estrogen receptor interactions, and plasminogen activator-inducing activities of tamoxifen and hydroxy-tamoxifen isomers in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res.* **44**(1):112-9.
30. Furr BJ, Jordan VC. (1984). The pharmacology and clinical uses of tamoxifen. *Pharmacol ther.* **25**(2):127-205.
31. Jianying He, Kargacin ME, Kargacin GJ, & Ward CA. (2003). Tamoxifen inhibits Na⁺ and K⁺ currents in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **285**(2):H661-8.

32. Lim YC, Desta Z, Flockhart DA, & Skaar TC. (2006). Endoxifen, a secondary metabolite of tamoxifen, and 4-OH-tamoxifen induce similar changes in global gene expression patterns in MCF-7 breast cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther.* **318**(2):503-12.
33. Sarkaria JN, Miller EM, Parker CJ, Jordan VC, & Mulcahy RT.(1994). 4-Hydroxytamoxifen, an active metabolite of tamoxifen, does not alter the radiation sensitivity of MCF-7 breast carcinoma cells irradiated in vitro. *Breast Cancer Res Treat.* **30**(2):159-65.
34. Lonning E. (1993) .Use of endocrine therapy to study the biology of breast cancer. *Cancer Treat Rev.* **19** Suppl B:65-77.
35. Lonning PE, Lien EA(1993). Pharmacokinetics of anti-endocrine agents. *Cancer Surv.* **17**:343-70.
36. Lu HR, Vlamincx E, Van de Water A, & Gallacher DJ. (2006). Calmodulin antagonist W-7 prevents sparfloxacin-induced early afterdepolarizations (EADs) in isolated rabbit purkinje fibers: importance of beat-to-beat instability of the repolarization. *J Cardiovasc Electrophysiol.* **17**(4):415-22.

37. Ravina T, Ravina P, & Gutierrez J. (2006). Acquired long QT syndrome: Long-term electrocardiographic (Holter) recording of Torsades de Pointes ending in asystole: II. *Int J Cardiol.* 2006 Jul 19.
38. Lankipalli RS, Zhu T, Guo D, & Yan GX. (2005). Mechanisms underlying arrhythmogenesis in long QT syndrome. *J Electrocardiol.* 38(4 Suppl):69-73.
39. Joshi A, Dimino T, Vohra Y, Cui C, & Yan GX. (2004). Preclinical strategies to assess QT liability and torsadogenic potential of new drugs: the role of experimental models. *J Electrocardiol.* 37 Suppl:7-14.
40. Kunkler K. (2002). Acquired long QT syndrome: risk assessment, prudent prescribing and monitoring, and patient education. *J Am Acad Nurse Pract.* 14(9):382-9.
41. Lehmann MH, Hardy S, Archibald D, quart B, & MacNeil DJ. (1996). Sex difference in risk of torsade de pointes with d,l-sotalol. *Circulation.* 94(10):2535-41.
42. Lehmann MH. (1997). QT prolongation in end-stage liver disease: a result of altered sex hormone metabolism? *Hepatology.* 26(1):244.

43. Rautaharju PM, Zhou SH, Wong S, Calhoun HP, Berenson GS, Prineas R, & Davignon A. (1992). Sex differences in the evolution of the electrocardiographic QT interval with age. *Can J Cardiol.* **8**(7):690-5.
44. Bezzina CR, Wilde AA, & Roden DM. (2005). The molecular genetics of arrhythmias. *Cardiovasc Res.* **15**;67(3):343-6.
45. Diaz M. (2002). Triphenylethylene antiestrogen-induced acute relaxation of mouse duodenal muscle. Possible involvement of Ca²⁺ channels. *Eur J Pharmacol.* **445**(3):257-66.
46. Best L. (2002). Inhibition of glucose-induced electrical activity by 4-hydroxytamoxifen in rat pancreatic beta-cells. *Cell Signal.* **14**(1):69-73.
47. Song J, Standley PR, Zhang F, Joshi D, Gappy S, Sowers JR, & Ram JL.(1996). Tamoxifen (estrogen antagonist) inhibits voltage-gated calcium current and contractility in vascular smooth muscle from rats. *J Pharmacol Exp Ther.* **277**(3):1444-53.
48. Thomas D , Kiesecker C, Alter M, Kathofer S, Zitron E, Scholz EP, Kreuzer J, Katus HA, Bauer A, & Karle CA. (2003). Atypical tetracyclic antidepressant maprotiline is an antagonist at cardiac hERG potassium channels . *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **368**(1):41-8.

49. Brouillette J, Clark RB, Giles WR, & Fiset C. (2004). Functional properties of K⁺ currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Physiol.* **15**;559(Pt 3):777-98.
50. Beato M & Klug G. (2000). Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update.* **6**(3):225-36.
51. Falkenstein E, & Ehling M. (2000). Nongenomically initiated steroid actions. *Eur J Clin Invest.* **30** Suppl 3:51-4.
52. Nadal A, Ropero AB, Fuentes E, & Soria B. (2001). The plasma membrane estrogen receptor: nuclear or unclear?. *Trends Pharmacol Sci.* **22**(12):597-9.
53. Levin ER. (2002). Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. *Steroids.* **67**(6):471-5.
54. Nadal FG, Atucha NM, Ortiz MC, Fortepiani LA, Martinez-Prieto C, & Garcia-Estan J. (2000). Mesenteric hyporesponsiveness in cirrhotic rats with ascites: role of cGMP and K⁺ channels. *Clin Sci (Lond).* **99**(5):455-60.
55. Lizotte E, Bruce G Allen, & Céline Fiset. (2003). Subcellular localization of sex steroid hormone receptors in mouse ventricles. *Biophys. J.* **84**(2):38a (abstract).

56. Collins P & Webb C. (1999). Estrogen hits the surface. *Nat Med.* **5**(10):1130-1
57. Li XQ, Hisaoka M, & Hashimoto H. (2003). Expression of estrogen receptors alpha and beta in soft tissue sarcomas: Immunohistochemical and molecular analysis. *Pathol Int.* **53**(10):671-9.
58. Razandi M, Pedram A, Merchenthaler I, Greene GL, & Levin ER. (2004). Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers. *Mol Endocrinol.* **18**(12):2854-65.
59. Song ZJ, King AO, Waters MS, Lang F, Zewge D, Bio M, Leazer JL Jr, Javadi G, Kassim A, Tschaen DM, Reamer RA, Rosner T, Chilenski JR, Mathre DJ, Volante RP, & Tillyer R.(2004). An efficient asymmetric synthesis of an estrogen receptor modulator by sulfoxide-directed borane reduction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **20**;101(16):5776-81.
60. Chen Z, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA,& Zhao H. (2004). Directed evolution of human estrogen receptor variants with significantly enhanced androgen specificity and affinity. *J Biol Chem.* **6**;279(32):33855-64.
61. Yang GS. & Chen ZD. (2004). Comparative studies of the expression of estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta in prostatic carcinoma. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi.* **22**;42(18):1111-5.

62. Fang H, Tong W, Shi LM, Blair R, Perkins R, Branham W, Hass BS, Xie Q, Dial SL, Moland CL, &Sheehan DM. (2001). Structure-activity relationships for a large diverse set of natural, synthetic, and environmental estrogens. *Chem Res Toxicol.* **14**(3):280-94
63. Eghbali M, Deva R, Alioua A, Minosyan TY, Ruan H, Wang Y, Toro L, Stefani E. (2005). Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy. *Circ Res.* **96**(11):1208-16
64. Trepanier-Boulay V, St-Michel C, Tremblay A, Fiset C. (2001). Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. *Circ Res.* **89**(5):437-44